



SCIENCES SUP

Cours et exercices corrigés

1^{er} cycle/Licence • Pharmacie

ANALYSE CHIMIQUE

Méthodes et techniques
instrumentales modernes

6^e édition

Francis Rouessac
Annick Rouessac

avec la collaboration de Daniel Cruché

DUNOD

ANALYSE CHIMIQUE

Consultez nos catalogues sur le Web

The screenshot displays the Dunod website's main interface. At the top, there is a search bar with the text "Recherche" and a dropdown menu set to "Par Titre". To the right of the search bar are links for "Collections" and "Index thématique". The Dunod logo is in the top left corner, with the text "Éditions VUE" and "Éditions Érudition" below it.

The main content area is divided into several sections:

- Accueil / Contact**: Navigation links.
- Interviews**: A section featuring two interviews. The first is titled "Comme vous avez changé ! Le sage maître de 90 ans de..." and the second is "Bons, pleins de...".
- Événements**: A section titled "Santé Valérie" and "En savoir le plus" with a "Special Révision" sub-section.
- Science et Technique**: A section with a book cover titled "IDS" and a description of "L'histoire et l'évolution des...".
- Information**: A section with a book cover titled "L'histoire et l'évolution des..." and a description of "L'histoire et l'évolution des...".
- Gestion et Management**: A section with a book cover titled "L'histoire et l'évolution des..." and a description of "L'histoire et l'évolution des...".
- Sciences humaines**: A section with a book cover titled "L'histoire et l'évolution des..." and a description of "L'histoire et l'évolution des...".
- LES TECHNOLOGIES DES MÉTIERS**: A section with a book cover titled "L'histoire et l'évolution des..." and a description of "L'histoire et l'évolution des...".

At the bottom of the page, there are links for "Bibliothèques des collèges", "universitaires", "bibliothèques", and "espaces".

www.dunod.com

ANALYSE CHIMIQUE

Méthodes et techniques instrumentales modernes

Cours et exercices corrigés

Francis Rouessac

Professeur émérite de l'université du Mans

Annick Rouessac

Maître de conférences honoraire

Avec la collaboration de Daniel Cruché

Professeur agrégé à l'IUT du Mans

Préface de

Guy Ourisson


Membre de l'Académie des Sciences

6^e édition

DUNOD

Illustrations intérieures : *Francis Rouessac*
Illustration de couverture : *Lionel Auvergne*

<p>Le pictogramme qui figure ci-contre mérite une explication. Son objet est d'alerter le lecteur sur la menace que représente pour l'avenir de l'écrit, particulièrement dans le domaine de l'édition technique et universitaire, le développement massif du photocopillage.</p> <p>Le Code de la propriété intellectuelle du 1^{er} juillet 1992 interdit en effet expressément la photocopie à usage collectif sans autorisation des ayants droit. Or, cette pratique s'est généralisée dans les établissements</p>	<p>d'enseignement supérieur, provoquant une baisse brutale des achats de livres et de revues, au point que la possibilité même pour les auteurs de créer des œuvres nouvelles et de les faire éditer correctement est aujourd'hui menacée.</p> <p>Nous rappelons donc que toute reproduction, partielle ou totale, de la présente publication est interdite sans autorisation de l'auteur, de son éditeur ou du Centre français d'exploitation du droit de copie (CFC, 20, rue des Grands-Augustins, 75006 Paris).</p>
--	--



DANGER
**LE PHOTOCOPIAGE
TUE LE LIVRE**

© Dunod, Paris, 2004
© Masson, Paris, 1992 pour la 1^{ère} édition
ISBN 2 10 048425 7

Le Code de la propriété intellectuelle n'autorisant, aux termes de l'article L. 122-5, 2^o et 3^o a), d'une part, que les « copies ou reproductions strictement réservées à l'usage privé du copiste et non destinées à une utilisation collective » et, d'autre part, que les analyses et les courtes citations dans un but d'exemple et d'illustration, « toute représentation ou reproduction intégrale ou partielle faite sans le consentement de l'auteur ou de ses ayants droit ou ayants cause est illicite » (art. L. 122-4).

Cette représentation ou reproduction, par quelque procédé que ce soit, constituerait donc une contrefaçon sanctionnée par les articles L. 335-2 et suivants du Code de la propriété intellectuelle.

Préface

Une lente évolution, lente, lente, se produit-elle dans les pratiques universitaires françaises ? Des livres scientifiques en français deviennent disponibles. En trente ans, on a vu disparaître les gros classiques d'avant-guerre, démodés, puis sortir quelques livres qui étaient essentiellement des notes de cours améliorées, peu diffusées sans doute parce que correspondant davantage à un besoin local qu'à une tentative sérieuse de rénover la pédagogie. Puis des traductions plus ou moins profondément remaniées de livres américains. Et enfin quelques ouvrages à succès, dont le grand nombre d'éditions, et le tirage, ont dû remplir d'aise auteurs et éditeurs – et cela parce qu'ils sont utiles aux étudiants et qu'ils sont originaux par rapport à leurs homologues étrangers.

S'il nous était possible depuis quelques années de conseiller aux étudiants de se procurer pour la Chimie Organique le « H.&C. », ou de leur indiquer que le niveau de Chimie Physique atteint en DEUG était celui de la 15^e édition du « A », il était bien difficile jusqu'ici de pouvoir miser sur un livre d'introduction générale en Chimie Analytique. Le « R », le Rouessac, va pouvoir combler cette lacune.

« Analyse Chimique », en fait, tel est son titre. Il y a quelques années, des collègues spécialisés en Chimie Analytique m'avaient effectivement expliqué que je confondais leur domaine et l'analyse chimique : la Chimie Analytique était une science désincarnée, éloignée des basses applications, celles de l'analyse chimique (notez le jeu d'initiales majuscules et minuscules). Pourtant, je n'en crois rien, et je n'ai jamais su si le cours de Chimie Analytique que j'ai introduit à Strasbourg il y a une quinzaine d'années était Ceci ou cela. Le Rouessac est l'un ou l'autre. Son sous-titre est plus explicite : il s'agit de « Méthodes et Techniques Instrumentales Modernes ». Explicite, mais peu informatif : l'analyse chimique s'est toujours faite à l'aide d'instruments, et ils n'ont jamais cessé de se moderniser. Pendant longtemps, le plus important a été la balance ; il reste essentiel (et on peut espérer qu'une prochaine édition du R. décrira ce qu'est devenue cette méthode instrumentale moderne - il y suffira de quelques pages).

Aujourd'hui, ce sont des méthodes bien plus variées et plus complexes qui font la loi dans les laboratoires. Le R. les décrit de façon systématique et simple, mais précise. Que ce soit pour les méthodes de séparation comme, bien sûr, toutes les variantes des chromatographies, ou pour les méthodes d'identification structurale on y trouvera une introduction bien équilibrée. Livre d'enseignement, le R. l'est dans la mesure où un chimiste qui en connaîtrait tout le contenu (et aurait reçu une initiation pratique, bien sûr) ne serait guère en peine de se rendre utile dans n'importe quel laboratoire. Livre d'enseignement réussi, il l'est aussi, par le soin qu'il met aux explications.

Une préface élogieuse se doit d'évoquer de futures éditions. Dans ces nouvelles versions, j'espère que F. Rouessac et son épouse pourront trouver la place de quelques compléments : sur la balance, je l'ai dit, mais aussi sur les méthodes électrochimiques, l'échantillonnage – si rarement discuté –, et sur le traitement des données numériques (conservation des données primaires, archivage, traitements statistiques, présentations graphiques, etc.).

Guy Ourisson
Membre de l'Académie des Sciences
23 avril 1992.

Table des matières

AVANT-PROPOS	XVII
INTRODUCTION	1
PARTIE 1 • MÉTHODES SÉPARATIVES	
L'invention de la chromatographie	6
CHAPITRE 1 • CHROMATOGRAPHIE, ASPECTS GÉNÉRAUX	7
1.1 Généralités sur la chromatographie analytique	7
1.2 Le chromatogramme	9
1.3 Pics d'élution gaussiens	11
1.4 Modèle des plateaux	11
1.5 Coefficient (ou Constante) de distribution de Nernst (K)	14
1.6 Efficacité d'une colonne	15
1.7 Grandeurs de rétention	17
1.8 Facteur de séparation (ou sélectivité) entre deux solutés	18
1.9 Facteur de résolution entre deux pics	19
1.10 Influence de la vitesse de la phase mobile	20
1.11 Optimisation d'une analyse chromatographique	23
1.12 Les diverses techniques chromatographiques	24
ANALYSE QUANTITATIVE PAR CHROMATOGRAPHIE	27
1.13 Principe et relation de base	27
1.14 Aires des pics et logiciels de chromatographie	27
1.15 Méthode de l'étalonnage externe	28
1.16 Méthode de l'étalonnage interne (étalon interne)	30
1.17 Méthode par normalisation interne	32
EXERCICES	33

CHAPITRE 2 • CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE	36
2.1 L'origine de la CLHP	36
2.2 Conception générale d'un appareil de CLHP	37
2.3 Pompes et gradients d'élution	38
2.4 Injecteurs	40
2.5 Colonnes	41
2.6 Phases stationnaires	42
2.7 Chromatographie liquide chirale	47
2.8 Phases mobiles	48
2.9 Chromatographie d'appariement d'ions	50
2.10 Chromatographie d'interaction hydrophobe	51
2.11 Principaux détecteurs	52
2.12 Tendances actuelles de la CLHP	57
EXERCICES	59
CHAPITRE 3 • CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE	61
3.1 Principe d'une installation de CPG	61
3.2 Gaz vecteur et régulateur de débit	63
3.3 Introduction de l'échantillon et chambre d'injection	64
3.4 Enceinte thermostatée	68
3.5 Colonnes	68
3.6 Phases stationnaires	70
3.7 Principaux détecteurs	73
3.8 Détecteurs conduisant à des données structurales	77
3.9 Chromatographie rapide	78
3.10 Indices de rétention et Constantes des phases stationnaires	80
3.11 Chromatographie « multidimensionnelle »	84
EXERCICES	85
CHAPITRE 4 • CHROMATOGRAPHIE IONIQUE	88
4.1 Principe de la chromatographie ionique (CI)	88
4.2 Phases stationnaires	90
4.3 Phases mobiles	92
4.4 Détecteurs à conductivité	94

4.5	Le supprimeur d'ions de l'électrolyte	95
4.6	Analyseurs d'acides aminés	96
	EXERCICE	99
	CHAPITRE 5 • CHROMATOGRAPHIE PLANAIRE	100
5.1	Mise en œuvre de la chromatographie planaire	100
5.2	Particularités liées à la CCM	102
5.3	Phases stationnaires	103
5.4	Paramètres de séparation et de rétention	105
5.5	CCM quantitative	105
	EXERCICES	107
	CHAPITRE 6 • CHROMATOGRAPHIE EN PHASE SUPERCRITIQUE	108
6.1	Rappel sur les fluides supercritiques	108
6.2	Les phases supercritiques comme phase mobile	109
6.3	Instrumentation en SFC	110
6.4	Comparaison de la SFC avec la CLHP et la CPG	111
6.5	Place de la SFC en chromatographie	112
	CHAPITRE 7 • CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE	114
7.1	Principe de la chromatographie d'exclusion stérique (CES)	114
7.2	Phases stationnaires et phases mobiles	115
7.3	Traitement du chromatogramme	117
7.4	Instrumentation	118
7.5	Domaines d'application	119
	EXERCICES	121
	CHAPITRE 8 • ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE ET ÉLECTROCHROMATOGRAPHIE	123
8.1	De l'électrophorèse de zone à l'électrophorèse capillaire	123
8.2	Mobilité électrophorétique et flux électro-osmotique	125
8.3	Instrumentation	129
8.4	Techniques électrophorétiques	131
8.5	Performances	133
8.6	Électrochromatographie capillaire (ECC)	135
	EXERCICES	137

PARTIE 2 • MÉTHODES SPECTROMÉTRIQUES

Les inventeurs de la colorimétrie	140
CHAPITRE 9 • SPECTROMÉTRIE D'ABSORPTION DE L'ULTRAVIOLET ET DU VISIBLE	141
9.1 Le domaine spectral UV-Vis et l'origine des absorptions	141
9.2 Le spectre UV-VIS	143
9.3 Transitions électroniques des composés organiques	144
9.4 Groupements chromophores	146
9.5 Effets dus aux solvants : solvatochromie	148
9.6 Règles de Woodward-Fieser	149
9.7 Instrumentation dans l'UV/Visible	150
9.8 Les différentes configurations des spectromètres UV/Vis	154
9.9 Analyse quantitative : lois de l'absorption moléculaire	158
9.10 Méthodes utilisées en analyse quantitative	161
9.11 Analyse d'un seul analyte et contrôle de pureté	162
9.12 Analyse multicomposants (MCA)	164
9.13 Méthodes de correction de ligne de base	167
9.14 Distribution des erreurs relatives dues aux appareils	168
9.15 Spectrométrie dérivée	169
9.16 Colorimétrie visuelle par transmission ou réflexion	171
EXERCICES	172
CHAPITRE 10 • SPECTROMÉTRIE DU MOYEN ET DU PROCHE INFRAROUGE	175
10.1 Origine de l'absorption lumineuse dans l'infrarouge	175
10.2 Présentation des absorptions dans l'infrarouge	176
10.3 Bandes de vibration-rotation dans l'infrarouge	177
10.4 Modèle simplifié des interactions vibrationnelles	178
10.5 Les composés réels	179
10.6 Bandes caractéristiques des composés organiques	181
10.7 Spectromètres et analyseurs infrarouges	182
10.8 Sources et détecteurs dans le moyen IR	187
10.9 Examen des échantillons	189
10.10 Spectroscopie d'imagerie chimique	193
10.11 Archivage des spectres	193

10.12 Comparaisons de spectres	197
10.13 Analyse quantitative	197
EXERCICES	202
CHAPITRE 11 • FLUORIMÉTRIE ET CHIMILUMINESCENCE	205
11.1 Fluorescence et phosphorescence	205
11.2 Origine de la fluorescence	206
11.3 Relation entre fluorescence et concentration	208
11.4 Diffusion Rayleigh et diffusion Raman	210
11.5 Instrumentation	212
11.6 Quelques applications de la fluorescence	215
11.7 Fluorimétrie résolue dans le temps	217
11.8 Chimiluminescence	218
EXERCICES	221
CHAPITRE 12 • SPECTROMÉTRIE DE FLUORESCENCE X	223
12.1 Principes de base	223
12.2 Le spectre de fluorescence X	224
12.3 Modes d'excitation des éléments en fluorescence X	226
12.4 Détection des rayons X	230
12.5 Les diverses catégories d'instruments	231
12.6 Préparation des échantillons	235
12.7 Absorption des rayons X - densimétrie X	236
12.8 Analyse quantitative par fluorescence X	237
12.9 Applications de la fluorescence X	237
EXERCICES	239
CHAPITRE 13 • ABSORPTION ATOMIQUE ET ÉMISSION DE FLAMME	242
13.1 Effet de la température sur un élément	242
13.2 Application aux appareils actuels	244
13.3 Absorption atomique contre Émission de flamme	245
13.4 Dosages par SAA ou par EF	246
13.5 Instrumentation de base en absorption atomique	247
13.6 Photomètres de flamme	253

13.7	Correction des absorptions parasites	253
13.8	Perturbations physiques et chimiques	257
13.9	Sensibilité et limite de détection en SAA	258
	EXERCICES	260
CHAPITRE 14 • SPECTROMÉTRIE D'ÉMISSION ATOMIQUE		262
14.1	Spectrométrie d'émission optique des atomes (OES)	262
14.2	Principe de l'analyse par émission atomique	263
14.3	Procédés pour dissocier l'échantillon en atomes ou ions	264
14.4	Systèmes dispersifs et raies spectrales	267
14.5	Appareils simultanés et appareils séquentiels	269
14.6	Performances	272
14.7	Couplage CPG/émission atomique (CPG/ICP-OES)	273
14.8	Applications de la spectrométrie d'émission atomique	274
	EXERCICES	275
CHAPITRE 15 • SPECTROMÉTRIE DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE		277
15.1	Généralités	277
15.2	Interaction spin/champ magnétique pour un noyau	278
15.3	Les noyaux qui peuvent être étudiés par RMN	280
15.4	Théorie de Bloch pour un noyau dont $I = 1/2$	281
15.5	Fréquence de Larmor	282
15.6	Obtention du spectre par RMN impulsionnelle	284
15.7	Les processus de relaxation des noyaux	287
15.8	Le déplacement chimique	288
15.9	Mesure des déplacements chimiques	288
15.10	Noyaux blindés ou déblindés	289
15.11	Facteurs affectant les déplacements chimiques	290
15.12	Structure hyperfine – Couplages spin-spin	292
15.13	Couplages hétéronucléaires	292
15.14	Couplages homonucléaires	295
15.15	Découplage de spin et séquences particulières	298
15.16	Couplage CLHP/RMN	300
15.17	RMN du fluor et du phosphore	301

15.18 RMN quantitative	302
15.19 Analyseurs utilisant la RMN impulsionnelle	305
EXERCICES	310

PARTIE 3 • AUTRES MÉTHODES

Les analyses de trace	314
CHAPITRE 16 • SPECTROMÉTRIE DE MASSE	315
16.1 Principe de base	315
16.2 Le spectromètre de Bainbridge (1933)	318
16.3 Analyseurs électromagnétiques de type « EB »	320
16.4 Analyseurs à temps de vol (TOF)	323
16.5 Analyseurs à filtre quadripolaire par transmission	325
16.6 Analyseurs à piégeage d'ions par quadripole	329
16.7 Analyseurs à résonance cyclotronique (FTMS)	330
16.8 Performances des spectromètres de masse	332
16.9 Principaux procédés d'ionisation sous vide	335
16.10 Procédés d'ionisation à pression atmosphérique	339
16.11 Spectromètres de masse en tandem (MS/MS)	342
16.12 Détecteurs à ions	343
QUELQUES APPLICATIONS EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE	345
16.13 Identification au moyen d'une spectrothèque	345
16.14 Analyse de la composition élémentaire des ions	346
16.15 Mesure des rapports isotopiques d'un élément	349
16.16 Fragmentation des molécules organiques	350
EXERCICES	355
CHAPITRE 17 • MÉTHODES DE DOSAGE PAR MARQUAGE	357
17.1 Principe des méthodes de marquage	357
17.2 Dilution isotopique avec un marqueur radioactif	358
17.3 Méthode substœchiométrique	359
17.4 Tests radio-immunologiques (RIA)	359
17.5 Mesure des activités radio-isotopiques	360
17.6 Antigènes et anticorps	363
17.7 La méthode de dosage immunoenzymatique (EIA)	363

17.8	Autres techniques immunoenzymatiques	366
17.9	Avantages et défauts des tests ELISA en chimie	367
17.10	Fluoro-immunologie (IFA)	367
17.11	Marquage avec un isotope stable	368
17.12	Analyse par activation neutronique (NAA)	369
17.13	Sources de neutrons thermiques	369
17.14	Activité induite — Durée d'irradiation	370
17.15	Détection par comptage — principe des mesures	370
17.16	Applications	371
	EXERCICES	372
	CHAPITRE 18 • ANALYSEURS ÉLÉMENTAIRES	374
18.1	Analyses particulières	374
18.2	Analyse élémentaire organique	375
18.3	Analyseurs d'azote total	377
18.4	Analyseurs de soufre total	379
18.5	Analyseurs de carbone total	380
18.6	Analyseurs de mercure	380
	EXERCICES	382
	CHAPITRE 19 • MÉTHODES POTENTIOMÉTRIQUES	383
19.1	Généralités sur les cellules de mesure	383
19.2	Une électrode sélective particulière : l'électrode pH	385
19.3	Les principaux types d'électrodes ioniques sélectives	386
19.4	Les calculs et les différentes méthodes	389
19.5	Quelques applications	391
	EXERCICES	392
	CHAPITRE 20 • MÉTHODES VOLTAMPÉROMÉTRIQUES ET COULOMÉTRIQUES	394
20.1	Généralités sur la méthode voltampérométrique	394
20.2	L'électrode à goutte de mercure tombante	396
20.3	Polarographie à courant continu	396
20.4	Le courant de diffusion	397
20.5	Polarographie à impulsions	398

20.6	Détection voltampérométrique en CLHP et ECHP	400
20.7	Capteurs de type ampérométriques	401
20.8	Voltampérométrie à redissolution (<i>stripping voltammetry</i>)	405
20.9	Dosages coulométriques à courant ou à potentiel constant	406
20.10	Le dosage de l'eau d'après la méthode de Karl Fischer	407
20.11	Conduite d'un dosage selon la méthode de Karl Fischer	409
	EXERCICES	412
	CHAPITRE 21 • TRAITEMENT DES ÉCHANTILLONS	414
21.1	La nécessité d'un traitement préalable	414
21.2	Extraction en phase solide (SPE)	415
21.3	Cartouches d'immuno-extraction	417
21.4	Procédés de micro extraction	418
21.5	Extraction gazeuse sur colonne ou sur disque	419
21.6	Espace de tête (<i>headspace</i>)	420
21.7	Extraction par solvant à l'état supercritique	422
21.8	Réacteurs à digestion par micro-ondes	423
21.9	Analyseurs en ligne	424
	CHAPITRE 22 • PARAMÈTRES STATISTIQUES DE BASE	426
22.1	Valeur centrale, justesse et fidélité d'un ensemble de mesures	426
22.2	Variance et écart-type	427
22.3	Erreurs aléatoires ou « indéterminées »	429
22.4	Intervalle de confiance de la moyenne	431
22.5	Comparaison de résultats — Tests paramétriques	432
22.6	Test de rejet – Quotient Q ou test de Dixon	434
22.7	Courbes d'étalonnage	434
22.8	Méthodes robustes ou tests non-paramétriques	437
22.9	Optimisation par la méthode <i>un seul facteur à la fois</i>	438
	EXERCICES	439
	RÉPONSES AUX EXERCICES	441
	TABLE DES CONSTANTES PHYSICO-CHIMIQUES	454
	BIBLIOGRAPHIE	455
	INDEX	459

À nos enfants et petits enfants

Avant-propos

Ce manuel est destiné à donner un ensemble de connaissances de base sur les méthodes les plus souvent rencontrées actuellement en analyse chimique, qualitative, quantitative et structurale, dans des secteurs aussi variés que constituent les industries chimiques, pharmaceutiques, agroalimentaires, ainsi que ceux de l'environnement et des réglementations diverses.

Les méthodes passées en revue dans cet ouvrage sont classées en *méthodes séparatives*, *méthodes spectrales* et *autres méthodes*. Chacune d'elles fait l'objet d'une étude qui s'appuie sur les idées de base pour se prolonger par les principales techniques instrumentales correspondantes. L'ensemble est illustré de photographies, de nombreux dessins et schémas de principe, dont beaucoup s'inspirent d'instruments réels et de documents obtenus auprès des constructeurs. Afin de maintenir une taille raisonnable à l'ensemble de cet ouvrage, les méthodes plus rarement utilisées ou celles en évolution régressive, n'ont pas été traitées.

Rédigé aussi clairement que possible, le texte s'adresse à un large éventail d'étudiants des IUT (Départements chimie, mesures physiques, biologie appliquée...), des classes de techniciens supérieurs (BTS), des premiers cycles universitaires (DEUG, DEUST), ainsi qu'aux étudiants des seconds cycles scientifiques (licence, IUP, DESS) qui veulent compléter ou retrouver des connaissances de base, étudiées de manière fragmentaire. Ce livre devrait également être utile aux participants de cycles de formation continue, aux formations du CNAM et aux agents de maîtrise de l'industrie, confrontés aux problèmes d'analyse de composés chimiques ou qui ont l'intention de préparer des concours. Les besoins en analyse chimique dans des secteurs professionnels qui en étaient restés à l'écart, alliée au choix grandissant des techniques et instruments disponibles, justifient également l'information et la mise à niveau de nombreuses personnes dont les connaissances nécessitent un recyclage.

Ce livre a été conçu pour répondre aux besoins des lecteurs dans le domaine de la chimie analytique appliquée en tant qu'outil utilisé dans beaucoup de sciences expérimentales et domaines divers. Les connaissances requises pour aborder cet ouvrage correspondent à celles des étudiants en première année des premiers cycles universitaires, voire pour l'essentiel à celles des bacheliers scientifiques. Les auteurs se sont donc limités au rappel des principes fondamentaux et ont tenu compte de l'évolution des connaissances des étudiants dont l'approche des phénomènes physiques et le bagage mathématique ont évolué. Le texte comporte un minimum de rappels théoriques sur les phénomènes concernés, afin de ne pas écarter une partie des lecteurs auxquels ce livre est destiné. Les intéressés pourront, si nécessaire, aborder ultérieurement, sans difficulté majeure, la lecture d'ouvrages spécialisés, en ayant acquis avec ce livre une vision d'ensemble assez complète des méthodes actuelles et de leurs aspects pratiques.

Le contenu de ce livre reflète aussi le profond changement dans les techniques analytiques des laboratoires, qui résulte de l'accroissement de la demande, du volume des données qui en résulte, de l'informatisation et des besoins nouveaux en analyses de traces notamment.

Présenter plus d'une vingtaine de méthodes, avec des exercices (et leur corrigés) sur environ 450 pages peut sembler un défi, chacune d'elles pouvant faire l'objet d'un long développement compte tenu du grand nombre d'applications dont elles font toutes l'objet. C'est la raison pour laquelle les auteurs ont préféré se limiter à la présentation des outils plutôt que de décrire tout ce que leur usage permet de faire. Seules les méthodes ont un caractère universel. Les applications ont donc été simplement choisies dans un but illustratif.

Ce livre a pour origine le cours et les travaux dirigés effectués aux étudiants de l'IUT du Mans depuis de nombreuses années. Cette nouvelle édition a été actualisée et complétée, par rapport à la précédente. Une version proche de la 4^e édition de cet ouvrage a été traduite en langue anglaise. Elle a pour titre *Chemical Analysis, Modern Instrumentation Methods and Techniques*, John Wiley & Sons (Chichester, 2000). La 5^e édition a été traduite en langue espagnole. Elle a pour titre *Análisis Químico. Methodos y Técnicas Instrumentales Modernas*, McGraw-Hill Interamericana de Espana, S.A.U.

Les auteurs remercient Daniel Cruché, Professeur agrégé à l'IUT du Mans pour ses suggestions et qui a complété, pour certains chapitres, le nombre des exercices proposés.

Ils remercient également toutes les sociétés françaises et étrangères contactées pour leur information et qui ont toujours répondu favorablement. Leur aide a été tout à fait précieuse, étant donné que l'instrumentation analytique est un secteur qui s'imprègne sans retard des progrès technologiques dans des domaines très variés.

Les auteurs expriment enfin leur vive reconnaissance au professeur Guy Ourisson, Président de l'Académie des Sciences, pour le grand honneur qu'il leur a fait en acceptant de préfacer les premières éditions de ce livre.

Le Mans, Juillet 2004

F. Rouessac & A. Rouessac

Liste non exhaustive des sociétés qui ont aimablement accepté de fournir des renseignements et documents, dont certains sont reproduits dans ce livre :

Agilent Technologies, American Stress Technologies, Anotec, Antek, Arelco, Asoma, ATI, ATS, Aurora, Bio-Rad, Bosch, Bruker, Camag, Carbone-Lorraine, Chrompack, Ciba, CTTM, Daiiso Company, Desaga, Dionex, DuPont, EG& G-ORTEC, Erba Science, ETP Scientific, Eurolabo, Finnigan, Fisons-Instruments, Foxboro, Galileo, Grasby-Electronics, Hamamatsu, Hamilton, Imaging Sensing Technology, Jeol, Jenway, Jobin-Yvon, Jordan Valley, Labsystems, Leeman Labs., Leybolds, Merck, Metorex, Metrohm, Mettler-Toledo, Microsensor Technology, Nicolet, Oriel, Ortec, Oxford Instruments, Perkin-Elmer, PEsCiex, Pharmacia-Biotech, Philips, Photovac, Polymer Lab., PSS, Rheodyne, RTI, Scientec, Scientific Glass Company, Servomex, Shimadzu, Siemens, SMIS, Supelco, Tekmar, Teledyne, Thermo Electron, Thermo-Optek, Thermo-Quest, Thermo Jarrell Ash, Tosohaas, Varian, VG Instruments, Waters, Wilmad.

Introduction

La *chimie analytique* est une science proche de la chimie physique. Elle se rapporte à l'étude du comportement chimique et physique des composés purs ou en solution soumis à diverses conditions. En cela c'est une science fondamentale et quelquefois abstraite. Elle a aussi pour rôle d'interpréter les informations recueillies. Mais on la perçoit souvent sous son aspect appliqué, ayant pour objet de mettre en œuvre des méthodes appropriées dans le but d'acquérir des informations sur la *nature*, la *composition* et la *structure* de composés présents dans des échantillons variés. Cet aspect réduit de la chimie analytique n'est autre que l'*analyse chimique* qui rassemble toutes les méthodes et procédés permettant de résoudre les problèmes concrets d'analyse. Le terme *chimique* rappelle qu'il s'agit de l'analyse des *éléments chimiques* et des *composés définis* qui en dérivent.

Son étude implique d'aborder des domaines de connaissances variés. C'est une science multidisciplinaire, de transfert, dont les retombées se font dans toutes les sciences expérimentales. Elle fait appel pour parvenir à ses fins à beaucoup de notions dont certaines sont fort éloignées de la chimie, au sens habituel de ce terme.

En analyse chimique, il est d'usage de distinguer deux catégories de méthodes. La première regroupe les méthodes chimiques proprement dites qui mettent en jeu les propriétés chimiques pour obtenir l'information chimique sur la matière traitée et la seconde, dorénavant au premier plan, qui comprend les méthodes physiques et physico-chimiques utilisant des propriétés particulières de la matière pour aboutir à des mesures en relation avec cette même information chimique.

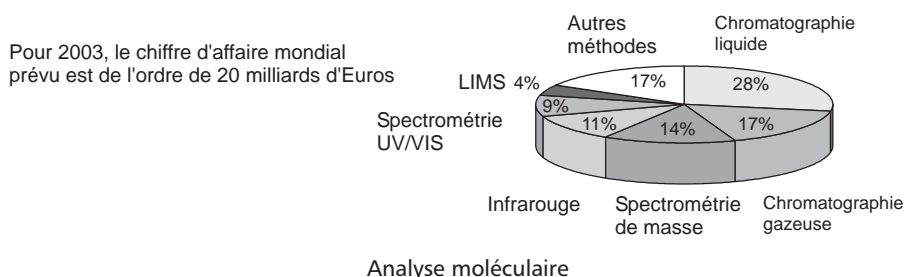
Les méthodes traditionnelles, dites par voie humide, — à l'origine du terme de *chimie analytique* — ont beaucoup diminué d'importance. Les analyses actuelles, dont plus de la moitié concerne des composés à l'état de traces, évitent en effet de mettre en jeu des réactions chimiques parce que souvent ces méthodes sont laborieuses, nécessitent des échantillons importants car moins sensibles et risquent d'être faussées si on doit utiliser des réactifs dont la pureté est insuffisante.

En revanche, un grand nombre d'analyses s'effectuent par l'intermédiaire d'instruments variés que l'on trouve souvent installés ailleurs que dans des laboratoires d'analyses classiques. Beaucoup relèvent par exemple de la spectroscopie appliquée. Ainsi est née l'analyse instrumentale avec son formidable arsenal de procédés, grâce auquel l'analyste est à même de répondre à des demandes de plus en plus nombreuses et variées

La chimie analytique est indispensable dans de nombreux secteurs autres que ceux, traditionnels, de la chimie ou de la parachimie. Elle est de plus en plus présente au sein des activités humaines. Ainsi on la retrouve dans le médical (elle débouche ainsi sur les diagnostics), la biochimie, l'agroalimentaire, l'environnement (pollution), la sécurité dans un monde souvent dangereux et dans de nombreux secteurs industriels.

Tout un chacun en bénéficie. Il n'est qu'à prendre pour exemples toutes les analyses sur la qualité de l'air, de l'eau, des aliments et autres produits essentiels, qu'entraînent les réglementations mises en place au niveau de l'Europe, ou concernant la libre circulation des produits.

Parmi les tendances actuelles de l'analyse on observe une augmentation des instruments portables et miniaturisés, des analyseurs spécifiques pour les drogues, les explosifs, les odeurs, les procédés, et des applications qui touchent l'environnement, la bio-pharmacie.



■ Une façon de définir l'importance d'une technique est de se reporter aux statistiques économiques concernant les ventes des instruments correspondants. La diffusion d'une technique se répercute sur la probabilité, pour l'analyste, de la rencontrer dans sa vie professionnelle. Ainsi, la statistique ci-dessus fait apparaître que la chromatographie, à elle seule, représente une large part du chiffre d'affaires de l'instrumentation d'analyse moléculaire (par opposition à l'analyse élémentaire, 2 fois moins importante). Dans ce domaine rien n'est figé. Des secteurs nouveaux de l'analyse émergent, des méthodes font leur apparition. Par ailleurs, l'aspect économique n'est pas le seul qui doit être pris en compte pour définir l'importance d'une méthode. Pour certaines analyses, une méthode, même très rare, peut être la plus importante, dès lors qu'elle est la seule à permettre de résoudre le problème posé.

L'analyse chimique fait preuve de beaucoup d'innovations. L'évolution des technologies a permis la réalisation d'instruments très performants, apportant des possibilités nouvelles, notamment avec l'introduction des méthodes couplées et des méthodes non destructives, — domaine du *contrôle non destructif* — qui se contentent de petits échantillons ne nécessitant pas, ou très peu, de préparation préalable à la mesure. Les utilisateurs peuvent désormais acquérir des appareils qui répondent à des normes de précision et de qualité, nécessaires pour accéder à la certification, étape importante sinon suffisante, pour faire reconnaître officiellement la qualité des résultats du laboratoire. Ces procédures d'accréditation sont imposées par de nombreux organismes de contrôle de tous pays.

Pour mener à bien ces études, l'analyste doit être formé aux différentes techniques. Il doit être expert et connaître les concepts de base de la chimie, sachant qu'il arrive souvent qu'un composé puisse être dosé par des méthodes différentes. Choisir une bonne méthode, et si possible la meilleure, exige la connaissance de beaucoup de paramètres. On doit se poser tout un ensemble de questions :

- de quel type d'échantillon s'agit-il (acier, terre, eau...) ?
- est-ce un constituant majeur, mineur ou à l'état de trace (moins de 0,01 %) ?

- s'agit-il d'une analyse partielle ou complète de l'échantillon ?
- l'échantillon doit-il être récupéré après la mesure ?
- l'analyse demandée est-elle unique ou sera-t-elle répétitive ?
- quel est le degré de précision nécessaire ?
- dispose-t-on du personnel compétent pour mener à bien l'analyse ?
- quel sera le coût de l'analyse ?
- quel est le laps de temps dont on dispose pour fournir le résultat ?
- quelle est la fiabilité des résultats de la méthode envisagée ?
- quelles sont les conséquences d'erreurs possibles ?

Ainsi lorsqu'un nouvel objectif d'analyse a été défini, le problème doit être abordé méthodiquement.

Au départ, compte tenu de la nature de l'analyte à doser, on doit faire le *choix de la méthode* : méthode spectroscopique, électrochimique, séparative...

Puis vient le *choix de la technique* : si, par exemple, on a choisi la méthode chromatographique, fera-t-on appel à la chromatographie en phase gazeuse ou à la chromatographie en phase liquide ?

Mais avant de commencer l'analyse, se pose également le *choix du procédé* relatif au prélèvement et au traitement préalable à faire subir à l'échantillon,

Enfin le suivi d'un *protocole* correspond au mode opératoire retenu. C'est la « recette du dosage », généralement un processus faisant l'objet de normes définies (AFNOR). Cette normalisation porte sur la standardisation des étapes, de la préparation de l'échantillon à la conduite des mesures.

Les résultats, enfin, seront établis suivant les normes en vigueur, et les données brutes de l'analyse seront conservées, par exemple sous forme d'un fichier informatique qui ne peut être réécrit. Cet aspect important du travail a fait l'objet de textes officiels connus sous le nom de Bonnes Pratiques de Laboratoire, ou BPL.

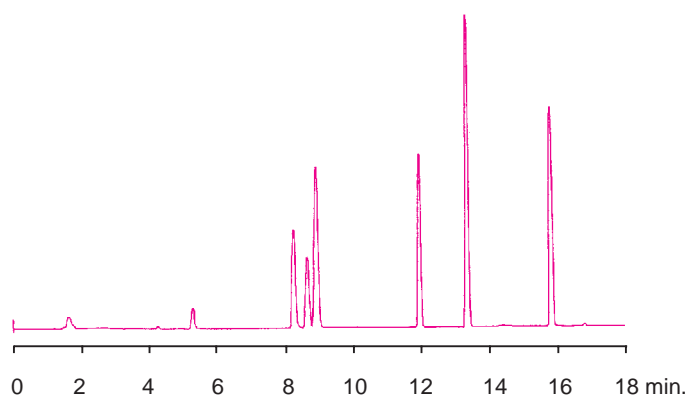
Pour conseiller la meilleure méthode afin de résoudre le problème d'analyse, il existe une science, appelée *chimométrie*. Elle a pour but de venir en aide à l'analyste, en fonction des impératifs exigés et selon plusieurs orientations : méthodologie appropriée, plan d'échantillonnage minimum, traitement des données et interprétation des résultats. En s'appuyant sur l'outil informatique, elle cherche à apporter une réponse correcte par exploitation des résultats au moyen des méthodes statistiques afin de réduire le nombre d'essais pour les analyses longues ou coûteuses.

En conclusion, la chimie analytique englobe l'analyse chimique et la chimométrie :

- L'analyse chimique qui a pour but de donner des résultats, généralement quantitatifs (concentrations) ;
- la chimométrie qui regroupe l'ensemble des méthodes d'exploitation et d'interprétation des résultats pour résoudre le problème posé.

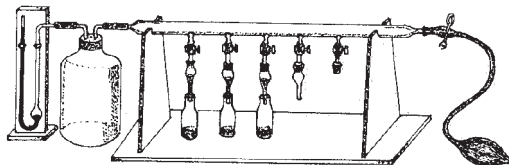
PARTIE 1

Méthodes séparatives



L'INVENTION DE LA CHROMATOGRAPHIE

On a coutume d'attribuer à Michel Tswett l'invention, peu après 1900, de la chromatographie actuelle. Au travers de ses publications successives, on peut en effet reconstituer sa démarche intellectuelle qui en fait un pionnier, si ce n'est l'inventeur, de cette importante méthode séparative. Son domaine de recherche était lié à la biochimie des plantes. À son époque on savait extraire avec de l'éthanol la chlorophylle et les autres pigments des plantes vertes, souvent des feuilles. En évaporant ce solvant, il restait un extrait noirâtre qui pouvait être redissous dans bon nombre d'autres solvants et en particulier dans l'éther de pétrole (on dirait maintenant des solvants polaires ou non polaires). Cependant on ne comprenait pas bien pourquoi ce dernier solvant était incapable d'extraire directement la chlorophylle des plantes. Tswett émit l'hypothèse que dans les plantes la chlorophylle devait être retenue par des forces qui la fixait sur la cellulose, empêchant ainsi l'éther de pétrole de l'extraire. Il entrevoyait ici le principe de l'adsorption. Pour tester cette hypothèse il eut l'idée de dissoudre l'extrait de pigments dans l'éther de pétrole et d'ajouter du papier filtre (cellulose), comme succédané du tissu des feuilles. Il s'aperçut alors que le papier captait la teinte et qu'en ajoutant de l'éthanol au mélange on pouvait ré-extraire ces mêmes pigments. En prolongement de ce travail, il décida de faire des essais systématiques avec toutes sortes de poudres dont il pouvait disposer. Pour gagner du temps, il avait réalisé un montage qui lui permettait de faire plusieurs essais simultanément.



Il plaçait les poudres à tester dans les tubes et il ajoutait à chacun d'eux une solution des pigments dans l'éther de pétrole. Cela lui permit d'observer que dans certains tubes les poudres laissaient apparaître des anneaux superposés aux couleurs différentes, ce qui témoignait que la force de rétention variait avec la nature des pigments présents. En rinçant les colonnes avec des solvants différents, il put recueillir séparément certains de ces constituants. La chromatographie moderne était née. C'est un peu plus tard, en 1906, qu'il rédigea la publication (parue dans Ber. Dtsch. Botan., Ges.), dans laquelle il écrivit le paragraphe le plus souvent cité : « Comme les radiations lumineuses dans le spectre, les différents composants d'un mélange de pigments, obéissant à une loi, se trouvent séparés sur la colonne de carbonate de calcium et peuvent ensuite être déterminés qualitativement et quantitativement. J'appelle une telle préparation un chromatogramme et la méthode correspondante la méthode chromatographique ».

Chapitre 1

Chromatographie, aspects généraux

La chromatographie est une méthode de séparation des constituants présents dans des mélanges variés. Elle sert en analyse pour identifier et quantifier des composés au sein d'échantillons divers. Le principe de base repose sur les équilibres de concentration qui apparaissent lorsqu'un composé est mis en présence de deux phases non miscibles. En chromatographie, l'une, dite stationnaire, est emprisonnée dans une colonne ou fixée sur un support et l'autre, dite mobile, se déplace au contact de la première. Si plusieurs composés sont présents, ils se trouvent entraînés à des vitesses différentes, provoquant leur séparation. Ce procédé hydrodynamique a donné naissance à une méthode analytique instrumentale qui a un très grand domaine d'applicabilité et par suite se trouve très répandue. Aucun laboratoire analysant des composés moléculaires ne peut ignorer la chromatographie.

1.1 GÉNÉRALITÉS SUR LA CHROMATOGRAPHIE ANALYTIQUE

La chromatographie est un procédé physico-chimique de séparation, au même titre que la distillation, la cristallisation ou l'extraction fractionnée, des constituants d'un mélange homogène liquide ou gazeux. Les applications de ce procédé sont donc potentiellement très nombreuses, d'autant plus que beaucoup de mélanges hétérogènes ou sous forme solide peuvent être mis en solution par emploi d'un solvant (celui-ci apparaissant comme un composé supplémentaire).

L'expérience de base en chromatographie peut être décrite comme suit (fig. 1.1) :

1. On immobilise dans une *colonne* un solide finement divisé appelé *phase stationnaire*.
2. On place au sommet de cette colonne un petit volume de l'*échantillon* à séparer.
3. On force cet échantillon à traverser la colonne de haut en bas au moyen de la *phase mobile* afin d'entraîner ses divers constituants. Si les composés présents migrent à des vitesses différentes, ils pourront être recueillis séparément, chacun en solution dans la phase mobile.

En dehors de cette exploitation de la chromatographie qui perdure depuis son origine, ce procédé est devenu en soi une méthode d'analyse lorsqu'on eut l'idée de mesurer les temps de migration des composés dans la colonne pour les identifier. Pour cela il devenait indispensable de maîtriser certains paramètres (débits, température...) et il fallait placer en sortie de colonne un détecteur pour repérer les changements de composition de la phase mobile.

Cette application de la chromatographie, dont le but n'est plus de récupérer les composés séparés mais de mesurer leurs temps de passage dans la colonne s'est développée lentement.

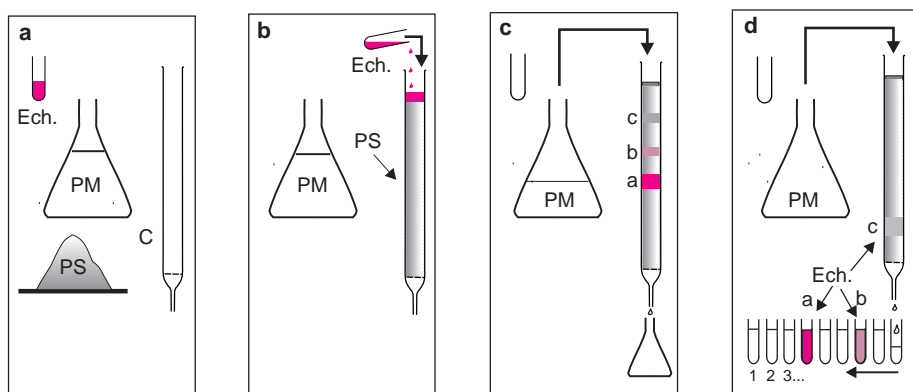


Figure 1.1 L'expérience de base en chromatographie.

a) Les ingrédients nécessaires C, colonne, PS, phase stationnaire, PM, phase mobile et E, échantillon ; b), le dépôt de l'échantillon ; c) le début de l'élution ; d) la récupération des produits après séparation.

L'identification d'un composé par chromatographie correspond à une méthode comparative.

Pour identifier un composé, dont on ne sait s'il s'agit de A ou de B, par la méthode chromatographique, on compare son *temps de migration* à ceux des deux composés de référence A et B, ceci, sans changer d'appareillage et en se plaçant dans les mêmes conditions expérimentales.

■ Dans une telle expérience de chromatographie analytique, on n'a pas effectué des séparations (il s'agit de produits purs) mais simplement repéré des temps de migration. Cependant il apparaît trois points faibles à cette méthode : le procédé est assez long de mise en œuvre, l'identification n'est pas absolue, et le contact physique entre l'échantillon et la phase stationnaire peut modifier ses propriétés à demeure, en particulier les temps de rétention.

Ce procédé particulier de fractionnement est né, sous sa forme moderne, au début du siècle dernier des travaux du botaniste Michaël Tswett à qui on attribue également l'invention des termes de *chromatographie* et de *chromatogramme*.

La technique s'est considérablement améliorée depuis ses débuts. On dispose actuellement de chromatographes pilotés par des logiciels qui rassemblent autour d'une colonne performante et miniaturisée – pour pouvoir séparer des micro-quantités d'échantillon – tout un ensemble d'accessoires destinés à assurer la répétabilité des expériences successives par la maîtrise parfaite des différents paramètres de séparation. Pour des analyses successives d'un même échantillon, réalisées dans des conditions identiques à plusieurs heures d'intervalle, les temps de rétention sont reproductibles à la seconde près (fig. 1.2).

Chaque séparation effectuée donne lieu à un enregistrement particulier appelé *chromatogramme*, qui correspond au tracé des variations de composition de la phase éluée au cours du temps. Pour obtenir ce document particulier, il faut placer à l'extrémité aval de la colonne un *capteur* dont il existe un grand nombre de variantes.

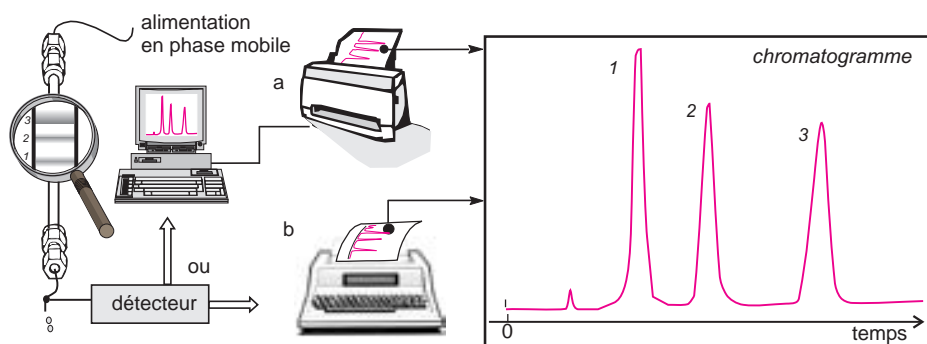


Figure 1.2 Principe de l'analyse par chromatographie.

Le chromatogramme, passage obligé de toute analyse chromatographique, est obtenu à partir des variations en fonction du temps d'un signal électrique envoyé par le détecteur. Il est soit présenté en temps réel soit en différé à partir des valeurs instantanées mises en mémoire dans un micro-ordinateur. Les logiciels de chromatographie recalculent ces valeurs pour être mises au format désiré (a, imprimante). Pendant longtemps il a été obtenu avec un simple enregistreur graphique ou un enregistreur-intégrateur (b). Chromatogramme illustrant la séparation d'un mélange de 3 constituants principaux. Noter l'ordre d'apparition des pics en correspondance avec la position de chaque constituant dans la colonne.

■ L'identification d'un composé moléculaire, à partir du chromatogramme, est quelquefois aléatoire. Une manière plus sûre consiste à associer deux techniques complémentaires. On réunit, par exemple, un chromatographe et un second appareil « en ligne », tel un spectromètre de masse ou un spectromètre infrarouge. Ces méthodes couplées, du second ordre (ou bidimensionnelles) permettent de récupérer deux types d'informations indépendantes (temps de migration et « spectre »). On peut alors déterminer avec certitude la composition de mélanges complexes ou la concentration de certains composés à partir de quantités de l'ordre du nanogramme (analyses de confirmation).

1.2 LE CHROMATOGRAMME

Le *chromatogramme* est une courbe qui traduit la variation au cours du temps d'un paramètre relié à la concentration instantanée du soluté en sortie de colonne (fig. 1.3). Le temps (ou très rarement le *volume d'élution*) est porté en abscisse et l'intensité du signal de détection en ordonnée. La *ligne de base* correspond au tracé obtenu en l'absence de composé élué. La séparation est complète quand le chromatogramme présente autant de *pics chromatographiques* revenant à la ligne de base qu'il y a de composés dans le mélange à analyser.

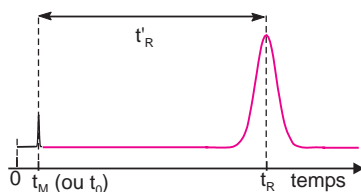
Un constituant est caractérisé par son *temps de rétention* t_R , qui représente le temps écoulé entre l'instant de l'injection et celui qui correspond sur le chromatogramme au maximum du pic qui lui est lié. Dans le cas idéal t_R est indépendant de la quantité injectée. Un constituant non retenu sort de la colonne au temps t_M , appelé temps mort ⁽¹⁾ (désigné également par t_0).

(1) Les symboles utilisés suivent les recommandations de l'IUPAC – *Pure & Appl. Chem.*, 65(4), 819, (1993).

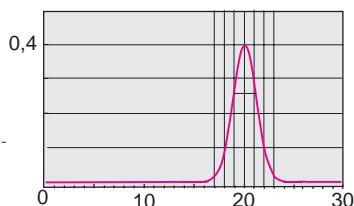
La différence entre le temps de rétention et le temps mort est désignée par le temps de rétention réduit du composé t'_R .

En analyse quantitative on se contente le plus souvent de bien séparer du mélange le ou les constituants à doser. Si le signal envoyé par le capteur varie linéairement avec la concentration d'un composé, il en sera de même de l'aire du pic correspondant sur le chromatogramme.

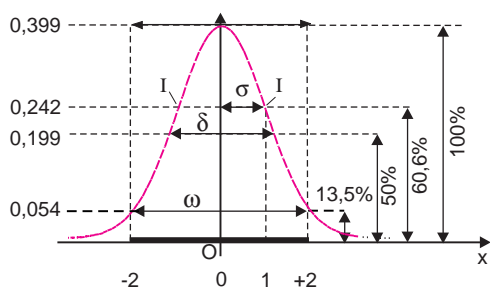
a) temps de rétention



b) courbe de Gauss avec μ 20 et $\sigma = 1$



c) caractéristiques du pic idéal



$$\delta = 2,35 \sigma$$

$$\omega = 4 \sigma$$

$$\omega = 1,7 \delta$$

l'aire comprise entre -2 et +2
vaut 95,4% de l'aire totale
comprise entre la courbe et
l'axe des x

d) comparaison entre un chromatogramme réel et des courbes gaussiennes

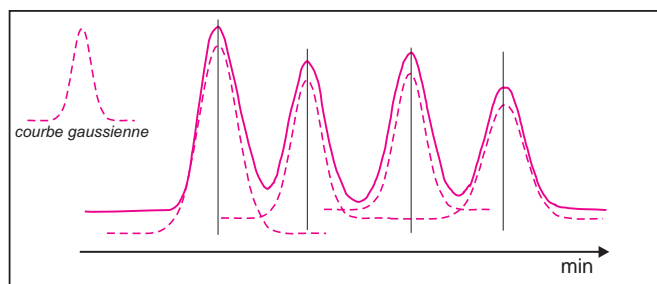


Figure 1.3 Pics chromatographiques.

a) Notion de temps de rétention ; b) exemple de tracé de la fonction 1.2 ; c) signification des trois paramètres classiques et résumé des caractéristiques d'une courbe de Gauss ; d) un exemple de chromatogramme réel qui montre que l'élution des composés peut conduire à des pics qui ressemblent vraiment à des courbes gaussiennes.

1.3 PICS D'ÉLUTION GAUSSIENS

Un pic d'élution idéal, sur un chromatogramme, a le même aspect que la représentation graphique de la loi Normale de distribution des erreurs aléatoires (courbe de Gauss 1.2, cf. § 22.3). En conservant les notations classiques, μ correspond ici au temps de rétention et σ à l'écart-type du pic d'élution (dont le carré symbolise la variance). y représente le signal, en fonction du temps x , du détecteur situé en sortie de colonne (fig. 1.3).

C'est pourquoi, afin de modéliser le signal d'un pic d'élution parfait d'un constituant, on se sert de la fonction « densité de probabilité » (1.2).

$$y = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot \exp \left[-\frac{(x - \mu)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (1.1)$$

$$y = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \cdot \exp \left[-\frac{x^2}{2} \right] \quad (1.2)$$

Cette fonction caractérise une courbe paire (maximum pour $x = 0$, $y = 0,399$) qui possède deux points d'inflexion pour $x = \pm 1$ (fig. 1.3), dont l'ordonnée est de 0,242 (soit 60,6 % de la valeur du maximum) et dont la largeur aux points d'inflexion est égale à 2σ , ($\sigma = 1$).

En chromatographie, δ désigne la largeur à mi-hauteur ($\delta = 2,35 \sigma$) et σ^2 la variance du pic. La largeur « à la base » du pic, appelée ω est mesurée à 13,5 % de la hauteur, point où, la courbe étant gaussienne, on a $\omega = 4\sigma$ par définition.

■ Les chromatogrammes réels sont quelquefois loin de présenter des pics d'aspect gaussien. Il y a plusieurs raisons à cela. En particulier il se produit une irrégularité de concentration dans la zone de dépôt de la substance en tête de colonne. De plus, la vitesse de la phase mobile est nulle au niveau de la paroi et maximum au centre de la colonne. L'asymétrie observée d'un pic est traduite par deux paramètres appelés facteur d'asymétrie (F_a) et facteur de traînée (F_t), mesurés à 10 % de sa hauteur (pour la signification de a et b , voir figure 1.4) :

$$F_a = \frac{b}{a} \quad (1.3)$$

$$F_t = \frac{a+b}{2a} \quad (1.4)$$

1.4 MODÈLE DES PLATEAUX

Depuis un demi-siècle, différentes théories visant à modéliser la chromatographie ont été et continuent à être proposées. Les plus connues sont les approches statistiques (théorie stochastique), le modèle des plateaux, et l'approche par la dynamique moléculaire.

Pour expliquer le mécanisme de migration et de séparation des composés dans la colonne, le modèle le plus ancien, ou *modèle des plateaux* de Craig, est une approche statique, jugée obsolète, mais qui permet de décrire de manière simple les séparations.

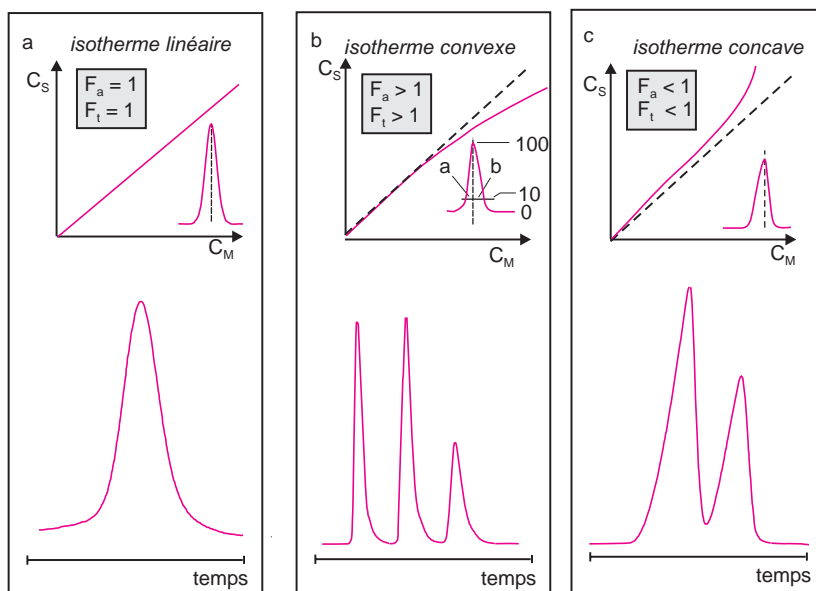


Figure 1.4 Isothermes de distribution.

a) Situation idéale correspondant à l'invariance de l'isotherme de concentration ; b) situation dans laquelle la phase stationnaire est saturée – de ce fait la montée du pic est plus rapide que la descente (facteur de traînée plus grand que 1) ; c) situation inversée : le constituant est trop retenu dans la phase stationnaire, le temps de rétention est allongé et la montée du pic est plus lente que la descente, qui apparaît normale. Pour chaque type de colonne, les fabricants indiquent quelle est leur capacité limite exprimée en ng/composé, avant déformation du pic. Les situations a, b et c sont illustrées avec des chromatogrammes réels en CLHP.

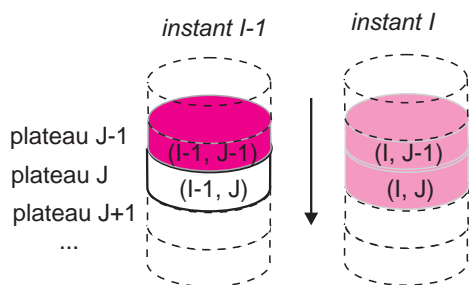
Bien que la chromatographie soit un phénomène continu, on considère dans le modèle statique de Craig, que chaque soluté se déplace progressivement en une suite d'étapes distinctes. Le processus élémentaire est représenté par un cycle d'adsorption/désorption. L'enchaînement de ces étapes reproduit la migration des fluides dans la colonne, de même qu'un film de dessins animés donne l'illusion du mouvement par un suite d'images fixes. Chaque étape correspond à un nouvel état d'équilibre de *toute* la colonne.

Ces équilibres successifs sont à la base de la notion de *plateau théorique* selon lequel la colonne de longueur L est découpée en N petits disques fictifs de même hauteur H , numérotés de 1 à n . Pour chacun d'eux, la concentration du soluté dans la phase mobile est en équilibre avec la concentration dans la phase stationnaire de ce soluté. À chaque nouvel équilibre le soluté a progressé d'un petit disque supplémentaire dans la colonne, appelé *plateau théorique*.

La hauteur équivalente à un plateau théorique (HEPT ou H) vaut donc (1.5) :

$$H = \frac{L}{N} \quad (1.5)$$

Cette approche fait appel aux règles de développement des polynômes pour calculer, au niveau de chaque plateau, les masses réparties entre les deux phases en présence.



Si on se place à l'instant I , le plateau J contient une masse totale de soluté m_T qui se compose de la quantité m_M de ce soluté qui vient d'arriver de la phase mobile du plateau $J - 1$, en équilibre à l'instant $I - 1$, à laquelle s'ajoute la quantité m_S déjà présente dans la phase stationnaire du plateau J à l'instant $I - 1$.

$$m_T(I, J) = m_M(I - 1, J - 1) + m_S(I - 1, J)$$

En posant que pour chaque plateau $m_S = Km_M$ et $m_T = m_M + m_S$, on peut, par une formule de récurrence, calculer m_T (ainsi que m_M et m_S). Étant donné que, pour chaque plateau, le soluté est en équilibre de concentration entre les deux phases, la masse totale de soluté en solution dans le volume de phase mobile V_M de la colonne demeure constante, tant que le soluté n'a pas atteint son extrémité. Quant au chromatogramme, il correspond à la masse transitant par la phase mobile au $(N + 1)^{\text{e}}$ plateau (fig. 1.5) au cours des équilibres successifs. Cette théorie a pour défaut de ne pas tenir compte de la dispersion due à la diffusion des composés dans la colonne.

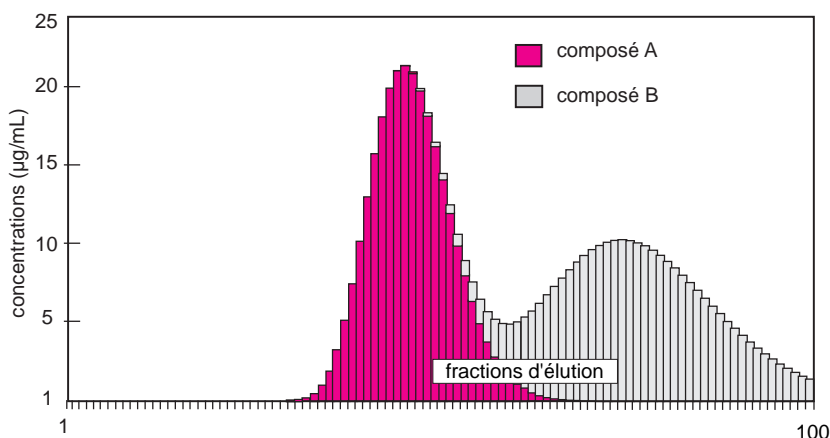


Figure 1.5 Modèle des plateaux.

Simulation à l'aide d'un tableur de l'élution de deux composés A et B, chromatographiés sur une colonne de 30 plateaux ($K_A = 0,6$; $K_B = 1,6$; $M_A = 300 \mu\text{g}$; $M_B = 300 \mu\text{g}$). Composition du mélange en sortie de colonne pour les 100 premiers équilibres. L'application de ce modèle montre à l'évidence une forme de pic non symétrique. Cependant, compte tenu de la diffusion, et comme le nombre d'équilibres est très grand, la courbe prend de plus en plus nettement l'aspect d'une courbe de Gauss.

■ Le terme de plateau théorique vient d'une approche ancienne décrivant la chromatographie en prenant pour modèle la distillation par Martin et Synge (prix Nobel de chimie en 1952). Ce terme ancré pour des raisons historiques n'a pas la signification physique de son homonyme servant à mesurer les performances d'une colonne à distiller. Il aurait peut-être été préférable de le baptiser par exemple du nom de Tswett !

Le temps total t_R de migration du soluté dans la colonne peut être séparé en deux termes : le temps t_M pendant lequel il est dissous dans la phase mobile et où il progresse à la même vitesse que celle-ci, et le temps t_S pendant lequel il est fixé à la phase stationnaire et où il est donc immobile. Entre deux transferts successifs d'une phase à l'autre, on admet que les concentrations ont le temps de se rééquilibrer.

■ La chromatographie fait intervenir au moins trois équilibres : soluté/phase mobile, soluté/phase stationnaire et phase mobile/phase stationnaire. Dans une théorie récente de la chromatographie, on ne parle plus de molécules immobilisées par la phase stationnaire mais simplement ralenties lorsqu'elles passent à proximité.

1.5 COEFFICIENT (OU CONSTANTE) DE DISTRIBUTION DE NERNST (K)

C'est le paramètre physico-chimique de base en chromatographie qui quantifie le rapport de concentration de chaque composé entre les deux phases en présence.

$$K = \frac{C_S}{C_M} = \frac{\text{concentration du soluté dans la phase stationnaire}}{\text{concentration du soluté dans la phase mobile}} \quad (1.6)$$

Les valeurs de K sont très variables. Elles sont grandes (1 000, par exemple) lorsque la phase mobile est un gaz, et petites (2, par ex.) lorsque les deux phases sont à l'état condensé. Chaque composé n'occupant qu'un espace limité de la colonne et de plus avec une concentration variable, les valeurs vraies de C_M et de C_S ne sont pas accessibles mais leur rapport est constant.

■ **Chromatographie et thermodynamique.** Les relations de la thermodynamique s'appliquent aux équilibres de distribution ci-dessus. K , (C_S/C_M), constante d'équilibre relative aux concentrations C du composé en présence des deux phases mobile (M) et stationnaire (S), est calculable à partir d'expériences de chromatographie. On peut donc accéder, connaissant la température de l'expérience, à la variation d'énergie libre standard ΔG^0 de cette transformation :

$$C_M \rightleftharpoons C_S \quad \Delta G^0 = -RT \ln K$$

Si, en chromatographie en phase gazeuse, par exemple, on détermine K à deux températures, il est possible de calculer (en admettant que l'enthalpie et l'entropie n'ont pas changé), les variations d'enthalpie standard ΔH^0 et d'entropie ΔS^0 :

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0$$

Les valeurs de ces trois paramètres sont négatives, en accord avec la spontanéité de cette transformation. Il est également logique que l'entropie diminue quand le composé quitte la phase mobile pour se fixer sur la phase stationnaire. De même l'équation de *van't Hoff* permet, entre autres, une approche plus rigoureuse de l'effet de la température sur les temps de rétention d'un composé. On comprend donc que dans toute étude complète de la chromatographie, on fasse appel à la thermodynamique classique.

$$\frac{d \ln K}{dT} = \frac{\Delta H}{RT^2}$$

1.6 EFFICACITÉ D'UNE COLONNE

1.6.1 Efficacité théorique (nombre de plateaux théoriques)

À mesure que le soluté migre dans la colonne, il occupe une zone allant s'élargissant (fig. 1.6). Cette dispersion linéaire σ_L , repérée par la variance σ_L^2 croît avec la distance parcourue. Lorsque cette distance vaut L , longueur de la colonne, on pose :

$$\sigma_L^2 = H \cdot L \quad (1.7)$$

En rappel du modèle de la théorie des plateaux, cette approche conduit à la valeur de la *hauteur équivalente à un plateau théorique* H et au nombre N de plateaux théoriques ($N = L/H$).

Donc, pour tout chromatogramme, à partir d'un pic d'élution d'un composé, dont on pourra mesurer la variance temporelle σ^2 , on pourra calculer pour le composé en question l'*efficacité théorique* N (1.8) et en déduire la valeur de H sachant que $H = L/N$.

$$N = \frac{L^2}{\sigma_L^2} \quad \text{ou} \quad N = \frac{t_R^2}{\sigma^2} \quad (1.8)$$

Ces deux paramètres sont accessibles de manière indirecte à partir du pic d'élution du composé. On mesure t_R et σ dont le rapport a même valeur que celui de L et de σ_L (1.8).

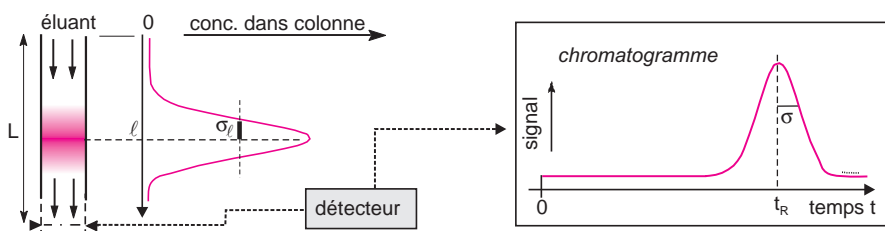


Figure 1.6 Dispersion d'un soluté dans une colonne et traduction sur le chromatogramme.

La courbe de gauche correspond à une image *isochrone* de la concentration du composé élué à l'instant considéré, et le chromatogramme de droite, à la variation de la concentration en sortie de colonne en fonction du temps. t_R et σ sont dans le même rapport que L et σ_L . L'efficacité N peut être calculée à partir du chromatogramme en utilisant un double décimètre. Sur le graphe ci-dessus on trouverait environ 100 plateaux théoriques.

Sur le chromatogramme, σ représente la demi-largeur du pic à 60,6 % de sa hauteur et t_R le temps de rétention du composé. t_R et σ doivent être mesurés dans la même unité (temps, distances ou volumes écoulés, si le débit est constant). Si on exprime σ en unités de volume (en faisant intervenir le débit), 4σ correspond au « volume du pic » soit 95 % du composé injecté. Par suite des propriétés de la courbe de Gauss ($\omega = 4\sigma$), il en résulte la formule 1.9. Les pics étant assez souvent déformés à la base, cette dernière est rarement employée : on utilise de préférence la formule équivalente 1.10.

N est un paramètre relatif, puisqu'il dépend à la fois du soluté et des conditions opératoires suivies. On choisit généralement un constituant qui apparaît en fin de chromatogramme.

gramme pour avoir une valeur repère, à défaut de savoir si la colonne permet de réussir une séparation donnée.

$$N = 16 \frac{t_R^2}{\omega^2} \quad (1.9)$$

$$N = 5,54 \frac{t_R^2}{\delta^2} \quad (1.10)$$

1.6.2 Efficacité réelle (nombre de plateaux théoriques effectifs)

Afin de comparer les performances de colonnes de conceptions différentes, vis-à-vis d'un même composé, – c'était notamment le cas en CPG lorsqu'on voulait comparer les performances d'une colonne capillaire et d'une colonne remplie – on remplace le temps total t_R qui figure dans les expressions 1.8 à 1.10 par le *temps de rétention réduit* t'_R qui ne tient pas compte du temps mort t_M passé par le composé dans la phase mobile. Les trois précédentes expressions deviennent :

$$N_{\text{eff}} = \frac{t_R'^2}{\sigma^2} \quad (1.11)$$

$$N_{\text{eff}} = 16 \frac{t_R'^2}{\omega^2} \quad (1.12)$$

$$N_{\text{eff}} = 5,54 \frac{t_R'^2}{\delta^2} \quad (1.13)$$

On considère actuellement que ces trois dernières relations ne sont plus de grande utilité.

1.6.3 Hauteur de plateau

La *hauteur équivalente à un plateau théorique* H a déjà été définie (formule 1.5). Ce paramètre est calculé pour des composés de référence car il permet de comparer des colonnes de longueurs différentes, bien qu'il ne s'agisse en aucune façon d'une constante. Sa valeur dépend du composé choisi et des conditions de l'expérience.

■ En chromatographie gazeuse, on a longtemps utilisé une valeur corrigée appelée hauteur de plateau effectif H_{eff} faisant intervenir l'efficacité réelle à la place de l'efficacité théorique.

Le calcul de H_{eff} à partir de l'efficacité réelle utilise l'expression 1.14 :

$$H_{\text{eff}} = \frac{L}{N_{\text{eff}}} \quad (1.14)$$

■ **Hauteur de plateau réduite.** En chromatographie dont la phase mobile est un liquide et pour les colonnes dont le remplissage est formé de particules sphériques, on rencontre assez souvent la hauteur de plateau réduite, h , qui tient compte du diamètre moyen d_m des particules. On élimine en quelque sorte l'effet de la taille des particules. Des colonnes présentant le même rapport (longueur de la colonne)/(diamètre des particules) conduisent à des performances semblables.

$$h = \frac{H}{d_m} = \frac{L}{N \cdot d_m} \quad (1.15)$$

1.7 GRANDEURS DE RÉTENTION

1.7.1 Temps de rétention

La définition du temps de rétention a été précédemment donnée dans le paragraphe 1.2.

1.7.2 Volume d'élution ou volume de rétention V_R

Le volume d'élution (de rétention) V_R de chaque soluté représente le volume de phase mobile nécessaire pour le faire migrer d'une extrémité à l'autre de la colonne. Il correspond sur le chromatogramme au volume de la phase mobile qui s'est écoulé entre l'instant de l'injection et celui correspondant au maximum du pic. Si le débit \mathcal{D} est stationnaire,

$$V_R = t_R \cdot \mathcal{D} \quad (1.16)$$

■ **Volume d'un pic, V_{pic} .** Il correspond au volume de phase mobile dans lequel le composé est dilué en sortie de colonne. Il vaut par définition :

$$V_{pic} = \omega \cdot \mathcal{D} \quad (1.17)$$

1.7.3 Volume de la phase mobile dans la colonne (volume mort V_M)

Le volume de la phase mobile dans la colonne (encore appelé volume mort) V_M correspond au volume interstitiel accessible. Il peut être calculé d'après le chromatogramme, à condition d'introduire un soluté non retenu par la phase stationnaire. On peut l'exprimer en fonction de t_M et du débit \mathcal{D} :

$$V_M = t_M \cdot \mathcal{D} \quad (1.18)$$

1.7.4 Volume de la phase stationnaire

Ce volume désigné par V_S n'apparaît pas sur le chromatogramme. Dans les cas simples on le calcule en retranchant du volume total interne de la colonne vide le volume de la phase mobile.

1.7.5 Facteur de rétention k (ou de capacité)

Quand un composé de masse totale m_T est introduit dans la colonne, il se répartit en deux quantités : m_M dans la phase mobile et m_S dans la phase stationnaire. Si on ne change pas les conditions opératoires, ces deux quantités demeurent constantes au cours de sa migration dans la colonne. Leur rapport, appelé *facteur de rétention*, est indépendant de m_T :

$$k = \frac{m_S}{m_M} = \frac{C_S \cdot V_S}{C_M \cdot V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad (1.19)$$

Le facteur de rétention, encore appelé *facteur de capacité* k , est un paramètre très important de la chromatographie. Il est défini en régime isocratique. Ce n'est pas une constante, bien qu'il ne varie pas avec le débit ou la longueur de la colonne, car il dépend des conditions opératoires. Pour cette raison il est quelque fois désigné par k' au lieu de k .

Ce paramètre rend compte de la faculté plus ou moins grande de la colonne à retenir chaque composé (*capacité*). Dans la mise au point des séparations on fait en sorte que k ne dépasse pas 10, afin de ne pas trop allonger le temps de passage des composés.

Approche expérimentale du facteur de rétention k

En s'appuyant sur le modèle de Craig, on imagine que chaque molécule d'un composé passe alternativement de la phase mobile (où elle progresse à la vitesse de celle-ci), à la phase stationnaire (où elle est alors immobile). Sa vitesse moyenne de progression dans la colonne est donc d'autant plus lente que le cumul des temps passés dans la phase stationnaire est plus grand.

Si on extrapole maintenant au cas de n molécules semblables de ce composé (l'échantillon de masse m_T), on admettra qu'à chaque instant, le rapport du nombre des n_S molécules fixées sur la phase stationnaire (masse m_S) et des n_M molécules présentes dans la phase mobile (masse m_M), est le même que celui des temps passés dans chaque phase pour une molécule isolée. Les trois rapports suivants ont donc même valeur :

$$\frac{n_S}{n_M} = \frac{m_S}{m_M} = \frac{t_S}{t_M} = k$$

■ Prenons le cas d'une molécule qui passe les $3/4$ de son temps dans la phase stationnaire. Sa vitesse moyenne sera 4 fois plus lente que si elle restait en permanence dans la phase mobile. Par conséquent si 4 μg de composé ont été introduits dans la colonne, il y aura en moyenne et en permanence 1 μg dans la phase mobile et 3 μg dans la phase stationnaire.

Sachant que le temps de rétention d'un composé t_R est tel que $t_R = t_M + t_S$, la valeur de k est donc accessible à partir du chromatogramme ($t_S = t'_R$) (voir figure 1.7) :

$$k = \frac{t'_R}{t_M} = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1.20)$$

Cette relation importante est également souvent rencontrée sous la forme :

$$t_R = t_M(1 + k) \quad (1.21)$$

Compte tenu des relations 1.16 et 1.18, le volume de rétention V_R d'un soluté pourra s'écrire :

$$V_R = V_M(1 + k) \quad (1.22)$$

ou :

$$V_R = V_M + K V_S \quad (1.23)$$

Cette dernière expression qui relie les paramètres expérimentaux au coefficient thermodynamique de distribution K est valable pour une chromatographie idéale.

1.8 FACTEUR DE SÉPARATION (OU SÉLECTIVITÉ) ENTRE DEUX SOLUTÉS

Le facteur de séparation α (1.24) permet de préciser les positions relatives de deux pics adjacents 1 et 2 sur un chromatogramme (fig. 1.7). Il est défini par les relations suivantes (1.24 et 1.25). Il ne peut, par définition, être inférieur à 1 :

$$\alpha = \frac{t'_{R(2)}}{t'_{R(1)}} \quad (1.24)$$

ou

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_2}{K_1} \quad (1.25)$$

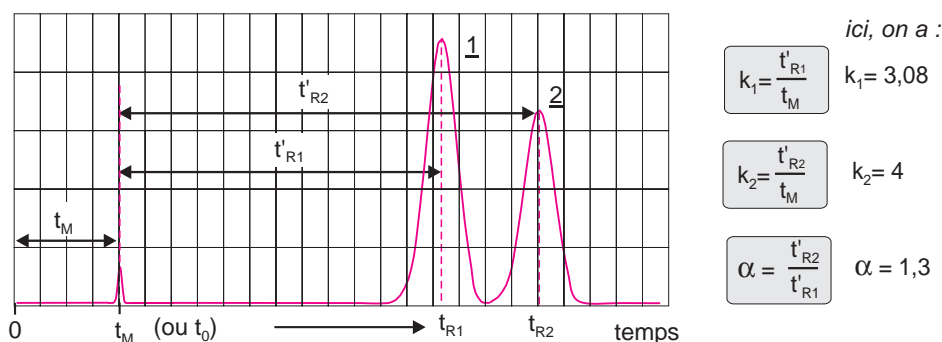


Figure 1.7 Facteurs de rétention et de séparation entre deux composés adjacents. Chaque composé a un facteur de rétention qui lui est propre. α à lui seul, ne permet pas de savoir si la séparation est réellement possible. Sur cette figure, le facteur de séparation est d'environ 1,3.

Pour des pics non adjacents, on définit le **facteur de rétention relative** r , qui, calculé comme α , ne peut être inférieur à 1.

1.9 FACTEUR DE RÉOLUTION ENTRE DEUX PICS

Pour traduire numériquement la plus ou moins bonne séparation entre deux composés, on utilise le facteur de résolution R qui est calculé à partir du chromatogramme (fig. 1.8) :

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2} \quad (1.26)$$

■ Il existe, pour exprimer la résolution, d'autres relations dérivées des précédentes, établies en vue de remplacer un paramètre par un autre, ou admettant des hypothèses simplificatrices. Ainsi les deux expressions 1.27 et 1.28 sont-elles très souvent employées.

La relation 1.28 montre l'influence, sur la résolution, de l'efficacité, du facteur de capacité et de la sélectivité. La figure 1.9 en est une vérification expérimentale.

$$R = 1,177 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\delta_1 + \delta_2} \quad (1.27)$$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \cdot \frac{\alpha - 1}{\alpha} \cdot \frac{k_2}{1 + k_2} \quad (1.28)$$

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \cdot \frac{k_2 - k_1}{k_1 + k_2 + 2} \quad (1.29)$$

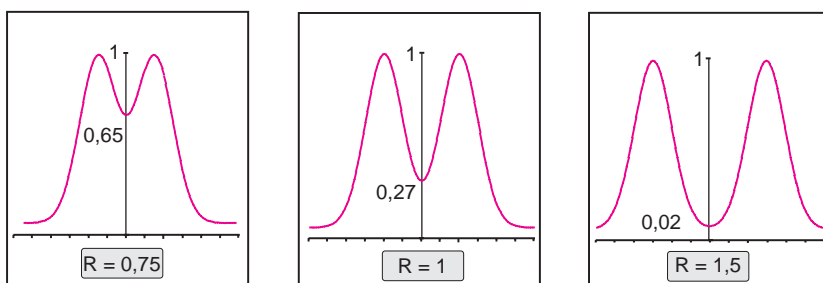


Figure 1.8 Facteur de résolution.

Simulation de pics chromatographiques par juxtaposition plus ou moins rapprochée de 2 courbes gaussiennes identiques. Aspect visuel correspondant aux valeurs de R indiquées sur les diagrammes. À partir de $R = 1,5$ on considère que les pics sont résolus, la vallée entre les pics étant d'environ 2 %.

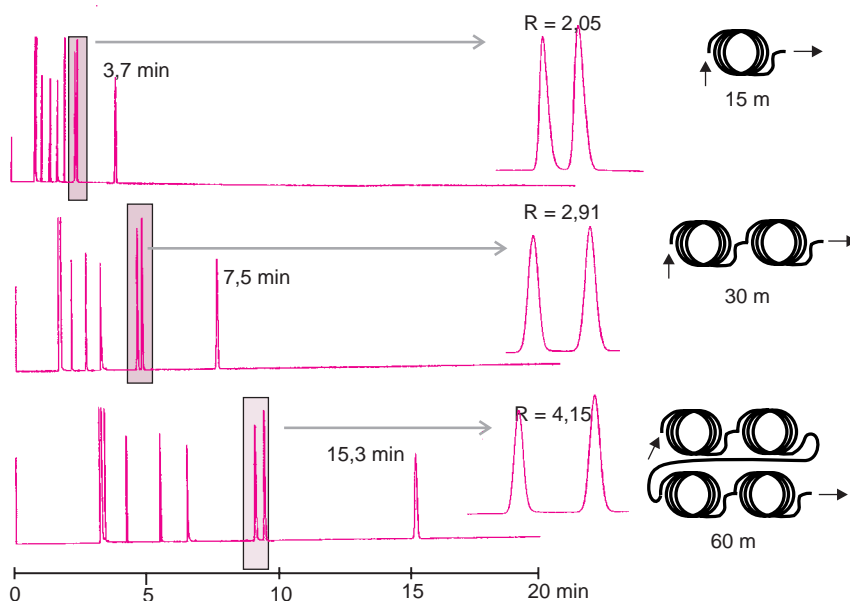


Figure 1.9 Effet de la longueur de la colonne sur la résolution.

Expériences faites en chromatographie en phase gazeuse en modifiant seulement la longueur de la colonne capillaire. On illustre ainsi qu'en doublant la longueur de la colonne la résolution est multipliée par 1,41 (adapté d'un document de la société Waters).

1.10 INFLUENCE DE LA VITESSE DE LA PHASE MOBILE

Dans tout ce qui précède, en particulier dans les différentes expressions caractérisant les séparations, la vitesse de la phase mobile dans la colonne n'est pas prise en compte. Or, de toute évidence, cette vitesse doit avoir une incidence sur la progression des analytes dans la colonne, donc sur leur dispersion, en bref sur la qualité de l'analyse en cours.

L'influence de la vitesse de la phase mobile a été mise en évidence par Van Deemter qui a proposé la première équation cinétique, dans le cas des colonnes remplies en chromatographie en phase gazeuse.

1.10.1 Équation de Van Deemter

La forme simplifiée, proposée par cet auteur en 1956, est très connue en chromatographie en phase gazeuse, pour les colonnes remplies (1.30). Elle relie H (HEPT) à la vitesse linéaire moyenne d'écoulement de la phase mobile \bar{u} dans la colonne (fig. 1.10) :

$$H = A + \frac{B}{\bar{u}} + C \cdot \bar{u} \quad (1.30)$$

Cette équation montre qu'il existe un *débit optimal* pour chaque colonne, correspondant au minimum de H , tel que le prévoit la courbe représentant l'équation 1.30. La diminution de l'efficacité, quand le débit croît, correspond à un résultat que chacun a pu découvrir à ses dépens en voulant accélérer une séparation chromatographique par augmentation du débit de la phase mobile. Ce qui est moins intuitif par contre, est la perte d'efficacité due à un débit trop lent. Pour expliquer ce phénomène, il faut revenir sur l'origine des termes A , B et C dont chacun a un domaine d'influence qui peut être repéré sur le graphe (fig. 1.10).

Les trois coefficients numériques expérimentaux A , B et C sont reliés à divers paramètres physico-chimiques, à la colonne et aux conditions opératoires. Si on choisit d'exprimer H en cm, A sera en cm, B en cm²/s et C en s (la vitesse étant en cm/s). La courbe représentative de cette fonction est une branche d'hyperbole qui passe par un minimum (H_{\min}) pour :

$$\bar{u}_{\text{opt.}} = \sqrt{\frac{B}{C}} \quad (1.31)$$

A, terme de remplissage $A = 2 \lambda \cdot d_p$

Le terme A est en relation avec le profil d'écoulement de la phase mobile à travers la phase stationnaire. La taille des particules (de diamètre d_p), leur répartition dimensionnelle et la régularité du remplissage (paramètre λ) sont à l'origine de chemins préférentiels qui peuvent conduire à des échanges imparfaits entre les deux phases. C'est le facteur de diffusion d'Eddy, ou diffusion turbulente, considéré comme peu important en chromatographie liquide et absent par nature pour les colonnes capillaires WCOT en CPG (équation de Golay sans terme A , cf. 1.10.2).

B, terme de diffusion dans la phase mobile $B = 2 \gamma D_G$

Le second terme B , qui peut être exprimé à partir de D_G , coefficient de diffusion de l'analyte dans la phase mobile et γ , facteur de tortuosité, est à considérer surtout si la phase mobile est un gaz. La diffusion longitudinale dans la colonne est, en effet, rapide. C'est une conséquence de l'entropie qui nous rappelle qu'un système évolue spontanément vers un plus grand désordre, telle la goutte d'encre qui diffuse dans le verre d'eau où elle vient de tomber. En conséquence, si le débit est trop faible, les produits en cours de séparation se mélangent à nouveau plus vite qu'ils ne migrent. On retiendra à ce propos qu'on ne doit jamais interrompre provisoirement une chromatographie en cours, au risque de perdre toute efficacité.

C, terme de transfert de masse $C = C_G + C_L$

Le terme C , dû à la résistance au transfert de masse du soluté entre les deux phases, devient prépondérant lorsque le passage est trop rapide pour que l'équilibre soit atteint. Des

turbulences locales au sein de la phase mobile et des gradients de concentration ont pour conséquence de retarder la mise en équilibre ($C_S \rightleftharpoons C_M$). La diffusion entre les deux phases n'est pas instantanée, si bien que le soluté sera entraîné hors équilibre. Il n'existe pas de formule simple rendant compte des différents facteurs intégrés dans le paramètre C . Le terme C_G dépend du coefficient de diffusion du soluté dans la phase mobile gazeuse, alors que le paramètre C_L dépend du coefficient de diffusion dans la phase stationnaire liquide.

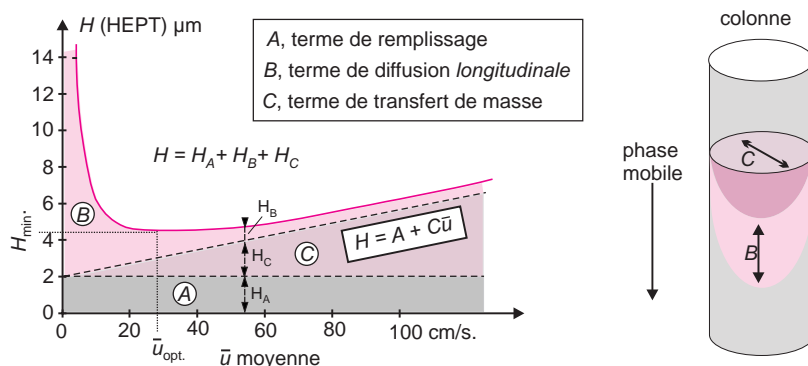


Figure 1.10 Courbe de Van Deemter en chromatographie gazeuse avec indication des domaines propres à A, B et C. Il existe également une équation semblable à celle de Van Deemter qui fait intervenir cette fois la température : $H = A + B/T + C \cdot T$.

■ Dans la pratique on accède aux valeurs des coefficients A, B, C, en faisant plusieurs mesures d'efficacité pour un même composé chromatographié à des débits différents, puisque débit et vitesse linéaire moyenne sont reliés. On calcule ensuite l'équation de l'hyperbole qui satisfait au mieux les valeurs expérimentales, de préférence par la méthode de régression linéaire multiple.

1.10.2 Équation de Golay

En 1958, Golay a proposé une équation comparable réservée aux seules colonnes capillaires de la chromatographie en phase gazeuse.

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + C_L \cdot \bar{u} + C_G \cdot \bar{u} \quad (1.32)$$

■ La relation 1.32 permet d'établir une HEPT minimum pour toute colonne de rayon r si l'on connaît le facteur de rétention du composé test.

On peut calculer alors l'efficacité d'imprégnation (coating efficiency) de la colonne qui est égale au produit par 100 du rapport de la valeur ainsi trouvée et de celle qui est déduite de l'efficacité ($H = L/N$) obtenue à partir du chromatogramme.

$$H_{\text{min. théo.}} = r \sqrt{\frac{1 + 6k + 11k^2}{3(1+k)^2}} \quad (1.33)$$

1.10.3 Équation de Knox

Une autre équation – connue sous le nom d'équation de Knox – plus récente (1977), est applicable aux divers types de chromatographie liquide. Elle fait intervenir la hauteur réduite :

$$h = A \bar{u}^{1/3} + \frac{B}{\bar{u}} + C \bar{u} \quad (1.34)$$

1.11 OPTIMISATION D'UNE ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE

La chromatographie analytique est essentiellement utilisée en analyse quantitative. À cette fin, il faut pouvoir déterminer les aires des pics des espèces à doser, donc les séparer. Pour y parvenir on fait de plus en plus souvent appel à des logiciels d'optimisation basés sur la connaissance du processus chromatographique. C'est l'étape de l'optimisation de l'analyse qui met à profit les connaissances de l'analyste et les ressources de l'appareil pour simuler les résultats à attendre des modifications de la composition de la phase mobile et d'autres paramètres physico-chimiques tels la température ou le pH dans le cas de substances ionisables.

■ En chromatographie en phase gazeuse, les séparations peuvent être si complexes qu'on ne peut déterminer par avance s'il est préférable de baisser ou d'élever la température. Le choix de la colonne, de sa longueur, de son diamètre, de la phase stationnaire, du rapport de phase ainsi que des paramètres de séparation (température et débit), sont autant de facteurs qui interagissent les uns sur les autres.

La *résolution* et le *temps d'élution* sont les deux variables dépendantes les plus importantes à considérer. Dans toute optimisation, le but est de réussir une séparation suffisante du ou des composés intéressants en un minimum de temps. Dans certains cas, il ne faut toutefois pas oublier le temps nécessaire à la colonne pour revenir aux conditions initiales avant d'effectuer l'analyse suivante. La chromatographie correspond en effet à un type d'analyse lente. Si la résolution est très bonne, l'optimisation aura encore sa raison d'être pour gagner du temps en utilisant une colonne plus courte – sachant que la résolution est affectée d'un facteur faisant intervenir la racine carrée de la longueur de la colonne (cf. le paramètre N de la formule 1.28 et la figure 1.9).

Quand on modifie le débit dans une séparation avec gradient on observe des changements importants sur le chromatogramme. La sélectivité entre pics est perturbée, comme le sont bien sûr les temps de rétention. La figure 1.11 illustre par un exemple l'optimisation d'une séparation, en chromatographie liquide, d'un mélange d'hydrocarbures aromatiques par modification de la composition de la phase mobile. On remarquera que cette optimisation s'accompagne d'une augmentation importante du temps d'analyse pour « boucler le cycle ».

Si on ne s'intéresse qu'à certains des composés présents, on peut faire appel à un détecteur sélectif qui ne verra, à la limite, qu'eux seuls. Dans d'autres cas, par contre, on s'attache à séparer le plus grand nombre possible de composés du mélange initial.

Suivant les types de chromatographie, l'optimisation est plus ou moins rapide. En chromatographie en phase gazeuse elle est plus facile qu'en chromatographie liquide où intervient la composition de la phase mobile : des logiciels ont été spécialement créés pour aider

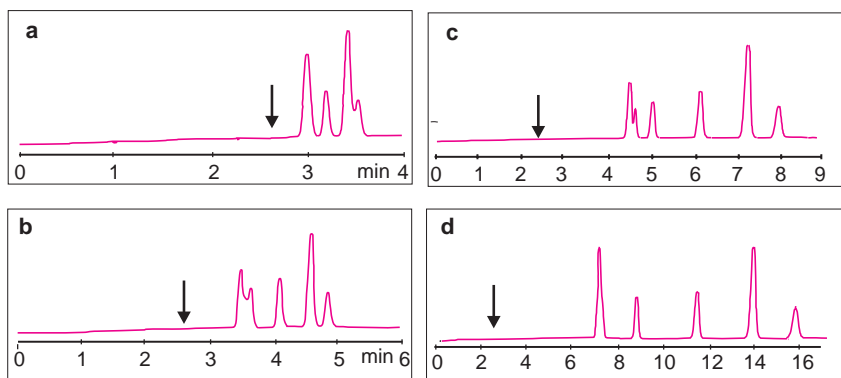


Figure 1.11 Chromatogrammes d'une séparation.

La phase mobile est un mélange binaire eau/acétonitrile : a) 50/50 ; b) 55/45 ; c) 60/40 ; d) 6/35. La flèche indique le temps mort t_M (min), (selon J.W. Dolan, *LC-GC Int*, 1994, 7(6), 333).

au meilleur choix de la composition de la phase mobile. Moyennant certaines hypothèses (pics gaussiens ou non), on peut calculer avec assez de précision les aires des pics mal résolus.

Le chromatographe est toujours prisonnier d'un triangle dont les sommets correspondent à la résolution, à la vitesse et à la capacité, trois paramètres qui s'opposent (fig. 1.12). Une chromatographie analytique optimisée utilise à plein le potentiel du paramètre le plus efficace : la sélectivité. Dans ce triangle elle se situe donc près du sommet *résolution*.

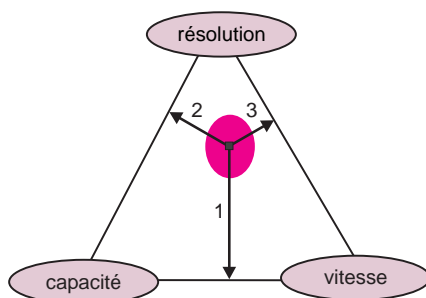


Figure 1.12 Le triangle des chromatographes.

La zone ombrée indique le domaine qui correspond à la chromatographie analytique. Celle-ci tire profit des 5 paramètres : K , N , k , α et R .

1.12 LES DIVERSES TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

Les techniques chromatographiques peuvent être réparties suivant plusieurs critères : en fonction de la *nature* des deux phases en présence, ou du *procédé utilisé*, ou du *phénomène physico-chimique* responsable du coefficient de distribution K vu précédemment (fig. 1.6).

Le classement suivi ci-après est établi à partir de la nature physique des phases (fig. 1.13).

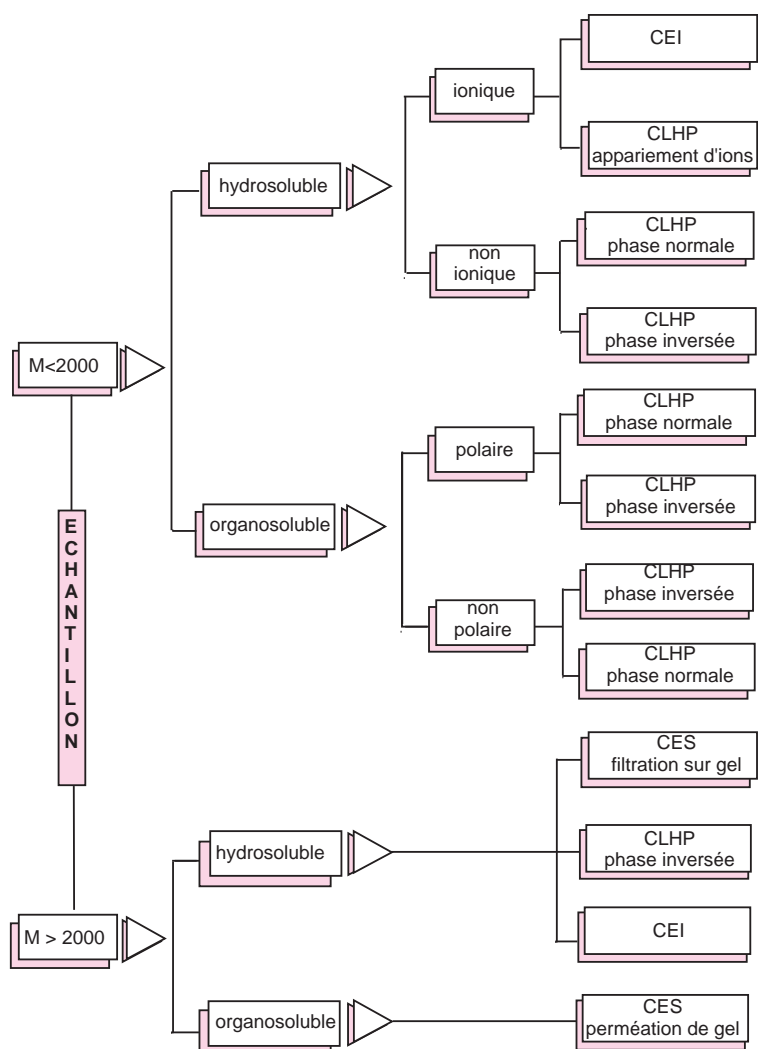


Figure 1.13 Guide de sélection se rapportant aux différentes techniques chromatographiques utilisant une phase mobile liquide. On choisira en fonction de la séparation à effectuer, la technique la mieux adaptée.

1.12.1 Chromatographie en phase liquide (CPL)

Ici la phase mobile est un liquide. C'est ce type de chromatographie auquel appartient la forme la plus anciennement connue en tant que méthode préparative de séparation. Cette catégorie très répandue peut être subdivisée d'après le phénomène mis en jeu :

Chromatographie liquide/solide (ou d'adsorption). La phase stationnaire est un milieu solide perméable sur lequel les molécules adhèrent par un double effet de physisorption et de chimisorption. Le paramètre physico-chimique concerné est le *coefficient d'adsorption*. Les phases stationnaires ont fait beaucoup de progrès depuis Tswett, qui utilisait le carbonate de calcium ou l'inuline (un polymère en poudre très fine du sucre ordinaire).

Chromatographie ionique. La phase stationnaire solide comporte en surface des sites ioniques et la phase mobile est une solution-tampon aqueuse. La séparation met en jeu des échanges entre les ions de l'échantillon avec ceux de la phase stationnaire. La séparation repose sur les *coefficients de distribution ionique*.

Chromatographie d'exclusion. La phase stationnaire est un matériau comportant des pores dont les dimensions sont choisies en rapport avec la taille des espèces à séparer. On réalise ainsi une sorte de perméation sélective à l'échelle moléculaire. Selon la nature, aqueuse ou organique de la phase mobile, cette technique est désignée par *filtration sur gel* ou *perméation de gel*. Le coefficient de distribution prend le nom de *coefficient de diffusion*.

Chromatographie liquide/liquide ou de partage (CLL). La phase stationnaire est un liquide immobilisé sur un matériau inerte et poreux qui n'a qu'un rôle de support. L'imprégnation, le procédé le plus ancien pour immobiliser un liquide, est une voie maintenant abandonnée, par suite d'un risque important de lessivage de la colonne.

Chromatographie liquide/phase greffée. Pour immobiliser la phase stationnaire (il s'agit généralement d'un polymère de type liquide), on fixe de manière définitive les espèces qui la composent par des liaisons covalentes : c'est la technique du *greffage*. La séparation repose sur le *coefficient de partage* K du soluté entre les deux phases, un phénomène comparable à l'extraction d'une phase aqueuse avec un solvant dans une ampoule à décanter.

1.12.2 Chromatographie en phase gazeuse (CPG)

La phase mobile est un gaz inerte et, comme précédemment, ce type de chromatographie peut être subdivisé selon le phénomène mis en œuvre :

Chromatographie gaz/liquide (CGL). La phase mobile est un gaz et la phase stationnaire est un liquide immobilisé soit par imprégnation, soit par greffage sur un support inerte lequel peut être tout simplement la paroi de la colonne. À défaut d'être un gaz, l'échantillon doit donc être porté à l'état de vapeur. Ce sont Martin et Synge qui ont suggéré le remplacement de la phase mobile liquide par un gaz afin d'améliorer les séparations. C'est à partir de cette époque qu'on assista au véritable démarrage de la chromatographie analytique. Ici encore c'est le coefficient de partage K qui est concerné.

Chromatographie gaz/solide (CGS). La phase stationnaire est un solide poreux (carbone graphite ou gel de silice ou alumine) et la phase mobile est un gaz. Ce type de CPG est très performant pour les analyses de mélanges de gaz ou de composés à bas point d'ébullition. Le paramètre concerné est le coefficient d'adsorption.

1.12.3 Chromatographie en phase supercritique

La phase mobile est un fluide à l'état supercritique, tel le dioxyde de carbone vers 50 °C et 150 bars (15 MPa). La phase stationnaire peut être un liquide ou un solide. On réunit ainsi les avantages propres aux techniques précédentes (gaz/phase greffée ou liquide/phase greffée).

ANALYSE QUANTITATIVE PAR CHROMATOGRAPHIE

Le développement considérable pris par la chromatographie en analyse quantitative est dû essentiellement à sa fiabilité et à sa précision. La relation entre la **masse injectée** de l'analyte dans la colonne et l'**aire du pic** correspondant sur le chromatogramme conduit à une méthode comparative, utilisée dans beaucoup de protocoles normalisés de dosages. La reproductibilité des séparations alliée à des logiciels de traitement de données permet d'automatiser les tâches de calcul associées à ces analyses. Les dosages de traces et d'ultratraces par chromatographie sont reconnus en particulier dans les méthodes EPA de l'environnement, bien que leur prix de revient soit assez élevé. Les trois méthodes les plus utilisées sont décrites ci-après dans leur configuration la plus simple.

1.13 PRINCIPE ET RELATION DE BASE

Pour calculer la concentration massique d'un composé responsable d'un pic sur le chromatogramme il faut réunir deux conditions : *disposer d'un échantillon authentique du composé* que l'on veut doser, à usage de référence, pour déterminer la sensibilité du détecteur à son égard, et disposer d'un moyen logiciel ou autre pour connaître soit les *hauteurs* soit les *aires* des différents pics d'élution d'intérêt. Toutes les méthodes de quantification en chromatographie sont donc des méthodes comparatives et non pas absolues.

Pour un réglage donné de l'appareil, on admet qu'il existe pour chaque pic du chromatogramme une relation linéaire entre son aire (ou sa hauteur) et la quantité du composé responsable de ce pic dans l'échantillon injecté. Cette relation est valable pour une plage de concentrations qui dépend du détecteur employé. On traduit cette hypothèse par :

$$m_i = K_i A_i \quad (1.35)$$

m_i masse du composé i injectée dans la colonne

K_i coefficient de *réponse absolu* du composé i

A_i aire du pic d'élution du composé i

Le coefficient absolu K_i (à ne pas confondre avec le coefficient de partition), dépend du réglage du chromatographe. Ce n'est pas un paramètre intrinsèque du composé.

Pour calculer le coefficient K_i d'un composé i , il faut, d'après cette relation, connaître l'aire A_i et la masse m_i traversant la colonne. Or cette masse est difficile à déterminer avec précision, car elle dépend à la fois de la seringue et de l'injecteur (en CPG) ou de la boucle d'injection (en CPL). C'est pourquoi les méthodes utilisées en analyse quantitative, préprogrammées dans les enregistreurs-intégrateurs ou logiciels divers, évitent de faire intervenir les coefficients de réponse absolus K_i .

1.14 AIRES DES PICS ET LOGICIELS DE CHROMATOGRAPHIE

Pour déterminer les aires des pics, on utilise les fonctions spécialement prévues des logiciels de chromatographie, qui assurent non seulement le pilotage du chromatographe, mais qui

peuvent, en plus de l'acquisition des chromatogrammes, analyser les données, quantifier et fournir le rapport d'analyse correspondant à l'une des méthodes d'analyse quantitative préprogrammées (fig. 1.14).

Le signal analogique récupéré au niveau du détecteur est échantillonné par un circuit ADC, au rythme d'une centaine de fois par seconde afin de pouvoir reproduire correctement les pics les plus fins des chromatogrammes obtenus notamment en CPG avec les colonnes capillaires. Tous les logiciels permettent d'effectuer des corrections de ligne de base, de prendre en compte les pics négatifs et de choisir une méthode d'intégration pour les pics.

- La méthode manuelle de calcul de la surface d'un pic par triangulation n'est plus employée. Il est utile cependant de savoir que pour un pic gaussien, le produit de sa largeur à mi-hauteur par sa hauteur, correspond à environ 94 % de la surface totale du pic. De même l'usage d'un enregistreur-intégrateur pour mesurer l'aire des pics n'est plus guère employé.

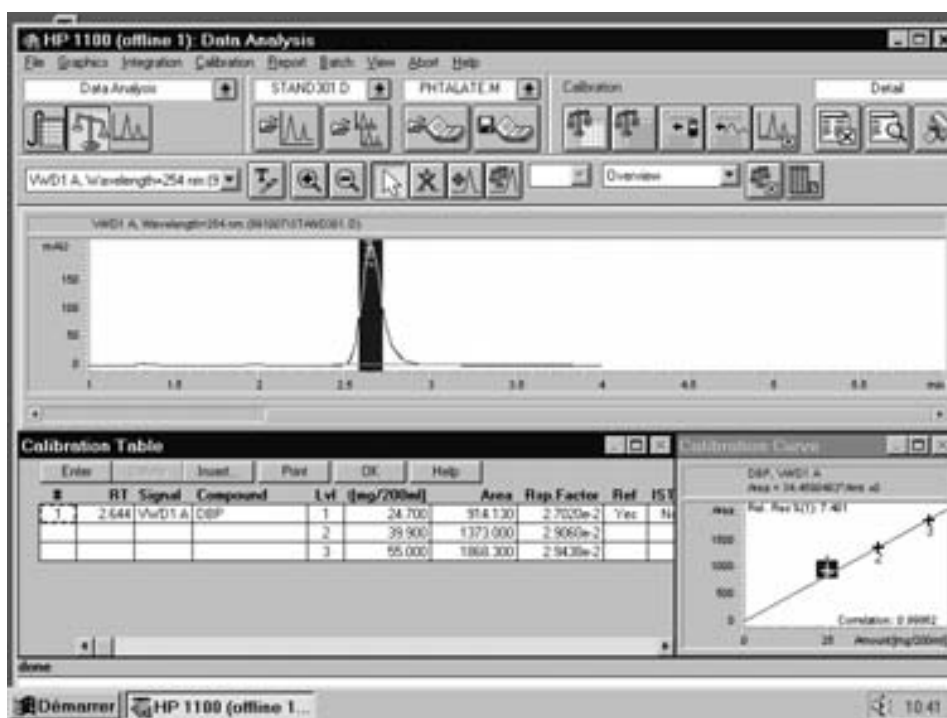


Figure 1.14 Un logiciel d'analyse quantitative en chromatographie.

Le signal du détecteur n'étant pas numérisé à la sortie du chromatographe, sa conversion analogique/numérique est assurée à l'entrée du micro-ordinateur. Le chromatogramme, mémorisé sous forme de nombres sert de base à l'exploitation par le logiciel. Différentes fenêtres de travail affichent aires, droite d'étalonnage, type de méthode etc. (Logiciel Chem-station de la société Agilent Technologies).

1.15 MÉTHODE DE L'ÉTALONNAGE EXTERNE

Cette méthode permet de calculer la teneur (en termes de concentration ou de pourcentage massique) d'un ou plusieurs constituants apparaissant séparés sur le chromatogramme,

même en présence d'autres composés donnant des pics non résolus. Facile de mise en œuvre, elle correspond à l'application d'un principe commun à beaucoup de dosages.

Le procédé repose sur la comparaison de deux chromatogrammes obtenus successivement *sans changer les conditions de réglage* de l'appareil (fig. 1.15). Le premier est un chromatogramme de référence acquis à partir d'une solution de référence (conc. $C_{\text{réf}}$) dans un solvant, du composé qui fait l'objet du dosage. On injecte un volume V de cette solution et on repère sur le chromatogramme l'aire $A_{\text{réf}}$ du pic correspondant. Le second résulte de l'injection d'un volume identique V de l'échantillon en solution, contenant le composé à doser (conc. $C_{\text{éch}}$). Soit $A_{\text{éch}}$ l'aire du pic correspondant. Puisque les volumes injectés sont égaux, il y a proportionnalité entre les aires, qui dépendent des masses injectées, et les concentrations correspondantes ($m_i = C_i \cdot V$). La relation 1.35 appliquée aux deux chromatogrammes conduit à la relation 1.36 caractéristique de cette méthode :

$$m_{\text{réf}} = C_{\text{réf}} \cdot V = K \cdot A_{\text{réf}} \quad \text{et} \quad m_{\text{éch}} = C_{\text{éch}} \cdot V = K \cdot A_{\text{éch}}$$

soit :

$$C_{\text{éch}} = C_{\text{réf}} \frac{A_{\text{éch}}}{A_{\text{réf}}} \quad (1.36)$$

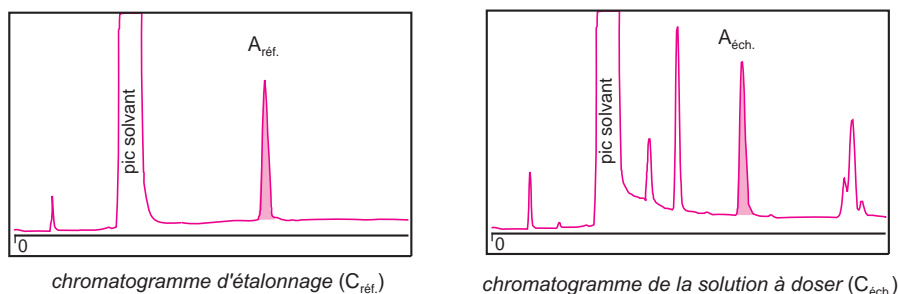


Figure 1.15 Méthode de dosage par étalonnage externe.

La précision de cette méthode est améliorée lorsqu'on utilise plusieurs solutions afin de tracer la droite d'étalonnage. Pour l'analyse de traces, il est parfois conseillé, en chromatographie liquide, de remplacer les aires des pics par leurs hauteurs qui sont moins sensibles aux variations de débit de la phase mobile.

L'étalonnage est possible, comme ici sur la figure 1.15, avec un seul point de mesure (la « droite d'étalonnage » passe donc par l'origine). La précision sera meilleure si les concentrations des solutions de référence et de l'échantillon sont du même ordre de grandeur. Il s'entend que les réglages de l'appareil ne doivent pas être modifiés entre les injections.

Cette méthode, faisant appel aux *coefficients de réponse absolus*, donne des résultats très fiables avec les chromatographes performants actuels qui sont équipés d'un auto-échantillonneur : ce dernier constitué de la réunion d'un carrousel porte-échantillons et d'un injecteur automatique permet d'enchaîner plusieurs dosages sans intervention humaine. Une seule solution de référence permet de compenser une éventuelle dérive de l'instrument par des ré-injections programmées de contrôle.

La précision du dosage est évidemment améliorée en calculant la moyenne des aires obtenues à partir de plusieurs injections identiques, mais, quitte à faire plusieurs mesures, il est alors préférable de procéder à un étalonnage multipoints (*multilevel calibration*). Pour

cela on injecte des volumes égaux d'une série de solutions étalons. Les résultats d'analyse sont directement obtenus à partir de la courbe d'étalonnage $A = f(C)$.

Cette méthode, la seule qui soit adaptée aux échantillons de gaz, a également pour avantage qu'on n'ajoute aucun composé à la solution échantillon, à la différence de celle qui fait l'objet du paragraphe suivant.

1.16 MÉTHODE DE L'ÉTALONNAGE INTERNE (ÉTALON INTERNE)

Cette deuxième méthode repose sur l'utilisation du *coefficient de réponse relatif* de chaque composé à doser vis-à-vis d'un marqueur introduit comme référence. Cela permet de s'affranchir de l'imprécision concernant les volumes injectés, un handicap de la précédente méthode.

La méthode nécessite, ici encore, deux chromatogrammes, l'un pour calculer les coefficients de réponse relatifs et l'autre pour l'analyse de l'échantillon.

Les aires des pics des produits à quantifier sont donc comparées avec celle d'un composé de référence, appelé *étalon interne*, introduit à une concentration connue dans l'échantillon.

1.16.1 Calcul des coefficients de réponse relatifs

Supposons que l'échantillon contienne deux composés à doser 1 et 2, et que le composé *E* désigne un composé supplémentaire à usage d'étalon interne (fig. 1.16).

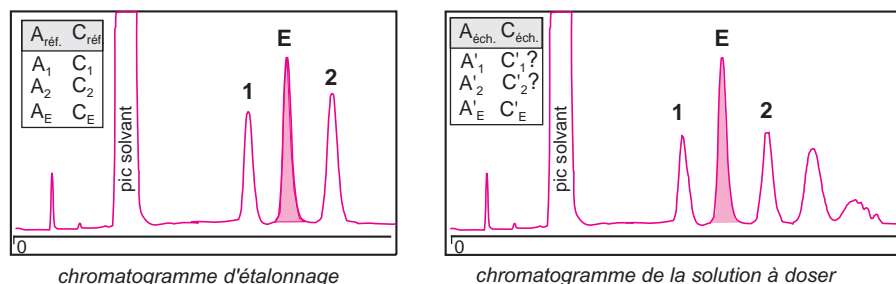


Figure 1.16 Méthode d'analyse par étalonnage interne.

Dans une première étape, on commence par préparer une solution de concentration C_1 en 1, C_2 en 2 et C_E en *E*. Appelons A_1 , A_2 et A_E les aires des pics d'élution repérés sur le chromatogramme obtenu à partir d'une prise d'essai de cette solution. Si m_1 , m_2 et m_E sont les quantités réellement introduites dans la colonne, on peut écrire les trois relations du type 1.35 suivantes :

$$m_1 = K_1 \cdot A_1$$

$$m_2 = K_2 \cdot A_2$$

$$m_E = K_E \cdot A_E$$

soit :

$$\frac{m_1}{m_E} = \frac{K_1 \cdot A_1}{K_E \cdot A_E} \quad \text{et} \quad \frac{m_2}{m_E} = \frac{K_2 \cdot A_2}{K_E \cdot A_E}$$

Ces rapports permettent de calculer les coefficients de réponse relatifs de 1 et de 2 vis-à-vis de E choisi comme étalon, et désignés par $K_{1/E}$ et $K_{2/E}$:

$$K_{1/E} = \frac{K_1}{K_2} = \frac{m_1 \cdot A_E}{m_E \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/E} = \frac{K_2}{K_E} = \frac{m_2 \cdot A_E}{m_E \cdot A_2}$$

Comme les masses m_i réellement injectées sont proportionnelles aux concentrations massiques correspondantes C_i , ($m_i = C_i \cdot V$)., on en déduit les deux expressions suivantes :

$$K_{1/E} = \frac{C_1 \cdot A_E}{C_E \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/E} = \frac{C_2 \cdot A_E}{C_E \cdot A_2}$$

1.16.2 Chromatographie de l'échantillon – Calcul des concentrations

La seconde étape de l'analyse consiste à chromatographier un volume quelconque d'une solution faite avec l'échantillon à étudier et dans laquelle a été ajoutée une quantité connue du composé E . Soient A'_1 , A'_2 et A'_E , les aires du nouveau chromatogramme obtenu dans les mêmes conditions opératoires. Si m'_1 , m'_2 et m'_E désignent les masses de 1, 2 et E réellement introduites dans la colonne, on aura :

$$\frac{m'_1}{m'_E} = K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad \frac{m'_2}{m'_E} = K_{2/E} \frac{A'_2}{A'_E}$$

À partir des coefficients relatifs calculés dans la première expérience ainsi que de la concentration de l'étalon interne dans l'échantillon, C'_E , connue, on accède à :

$$C'_1 = C'_E K_{1/E} \frac{A'_1}{A'_E} \quad \text{et} \quad C'_2 = C'_E K_{2/E} \frac{A'_2}{A'_E}$$

En généralisant à n constituants, on peut calculer la concentration massique du soluté i au moyen de l'expression 1.37 :

$$C'_i = C'_E K_{i/E} \frac{A'_i}{A'_E} \quad (1.37)$$

et en déduire sa teneur dans l'échantillon, exprimée en %, (expression 1.38) :

$$x_i \% = \frac{C'_i}{\text{Masse d'échantillon prélevée}} \times 100 \quad (1.38)$$

Cette méthode est encore plus précise si on fait plusieurs injections de l'étalon ou de l'échantillon à doser. En conclusion cette méthode générale et reproductible exige néanmoins un bon choix de l'étalon interne dont les caractéristiques peuvent se résumer ainsi :

- il doit être pur et ne pas se trouver initialement dans l'échantillon ;
- son pic d'élution doit être bien résolu par rapport à tous ceux qui forment le chromatogramme de l'échantillon ;
- son temps de rétention doit être proche de celui (ou de ceux) du (ou des) soluté(s) à doser ;
- sa concentration doit être proche ou supérieure à celle des autres solutés pour être dans les conditions d'une réponse linéaire du détecteur ;
- il doit être inerte vis-à-vis des composés de l'échantillon.

1.17 MÉTHODE PAR NORMALISATION INTERNE

Cette méthode, également appelée « 100 % normalisée », est réservée aux mélanges dont on a identifié tous les constituants par autant de pics d'élution séparés sur le chromatogramme, afin de pouvoir faire le bilan complet de l'échantillon concerné.

Supposons qu'il s'agisse de trouver les concentrations massiques d'un mélange de trois composés 1, 2, 3 (fig. 1.17). On va procéder ici encore en deux étapes.

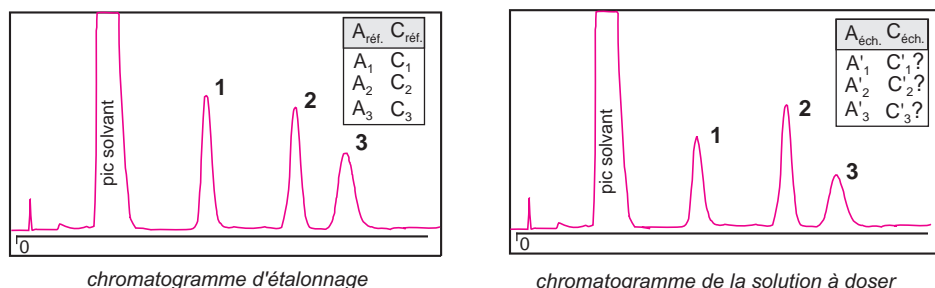


Figure 1.17 Méthode d'analyse par normalisation interne.

1.17.1 Calcul des coefficients de réponse relatifs

On prépare une solution d'étalonnage contenant les trois composés 1, 2, et 3 dont les concentrations massiques sont respectivement C_1 , C_2 , C_3 . Le chromatogramme correspondant à l'injection d'un volume V , présente trois pics d'aires A_1 , A_2 et A_3 . Ces aires seront reliées aux masses injectées m_1 , m_2 et m_3 par trois expressions du type 1.35.

On choisit l'un des composés comme substance de normalisation interne, le composé 3 par exemple, afin de déterminer les coefficients de réponse relatifs $K_{1/3}$ et $K_{2/3}$ des composés 1 et 2 par rapport à 3. On trouve comme précédemment :

$$K_{1/3} = \frac{K_1}{K_3} = \frac{m_1 \cdot A_3}{m_3 \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/3} = \frac{K_2}{K_3} = \frac{m_2 \cdot A_3}{m_3 \cdot A_2}$$

Étant donné que $m_i = C_i \cdot V$, on aboutit, pour $K_{1/3}$ et $K_{2/3}$, aux expressions suivantes :

$$K_{1/3} = \frac{C_1 \cdot A_3}{C_3 \cdot A_1} \quad \text{et} \quad K_{2/3} = \frac{C_2 \cdot A_3}{C_3 \cdot A_2}$$

1.17.2 Chromatographie de l'échantillon – Calcul des concentrations

On procède ensuite à l'injection d'un prise d'essai du mélange à doser contenant les constituants 1, 2 et 3. En désignant les surfaces des pics d'élution par A'_1 , A'_2 et A'_3 , on aura accès directement à la composition centésimale massique du mélange représentée par x_1 , x_2 et x_3 en écrivant trois expressions de la forme :

$$x_i \% = \frac{K_{i/3} \cdot A'_i}{K_{1/3} \cdot A'_1 + K_{2/3} \cdot A'_2 + A'_3} \times 100 \quad (\text{avec } i = 1, 2, 3)$$

la condition de normalisation étant que $x_1 + x_2 + x_3 = 100$

■ En extrapolant à n solutés normalisés par rapport à un soluté j , l'expression générale des facteurs de réponse est la suivante (pour un composé choisi i) :

$$K_{i/j} = \frac{C_i \cdot A_j}{C_j \cdot A_i} \quad (1.39)$$

Il est également possible de déterminer des $K_{i/j}$ moyens par tracé du graphe concentration-réponse pour chaque soluté.

Pour l'échantillon contenant n solutés, si A'_i désigne l'aire du pic d'élution du composé i , le composé servant de référence interne étant j , la teneur en composé i obéira à la relation :

$$x_i \% = \frac{K_{i/j} \cdot A'_i}{\sum_{i=1}^n K_{i/j} \cdot A'_i} \times 100 \quad (1.40)$$

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 1.1

On mélange dans un erlenmeyer 6 mL de gel de silice et 40 mL d'un solvant contenant en solution 100 mg d'un composé considéré comme non volatil. Après avoir bien agité ce mélange, on laisse décanter et on recueille 10 mL du solvant que l'on évapore. Le résidu pèse 12 mg.

Calculer le coefficient d'adsorption $K = C_S/C_M$ de ce composé dans cette expérience.

Exercice 1.2

Calculer le facteur de séparation entre 2 composés 1 et 2 dont les volumes de rétention sont respectivement égaux à 6 et 7 mL. Le volume mort de la colonne utilisée est de 1 mL.

Montrer que ce facteur est égal au rapport des coefficients de distribution K_2/K_1 de ces composés ($t_{R(1)} < t_{R(2)}$).

Exercice 1.3

Pour un soluté donné, montrer que le temps d'analyse — qu'on peut assimiler au temps de rétention du composé le plus retenu —, dépend, entre autres, de la longueur de la colonne L , de la vitesse linéaire moyenne \bar{u} de la phase mobile et des volumes V_S et V_M qui désignent respectivement le volume de la phase stationnaire et celui de la phase mobile.

Exercice 1.4

La formule (2) est quelquefois employée pour calculer N_{eff} . Montrer que cette formule est équivalente à la formule classique (1).

$$N_{\text{eff}} = 5,54 \frac{(t_R - t_M)^2}{\delta^2} \quad (1)$$

$$N_{\text{eff}} = N \frac{k^2}{(1 + k^2)} \quad (2)$$

Exercice 1.5

Le facteur de résolution R , pour deux solutés 1 et 2 dont les pics d'élution sont adjacents, est exprimé par la relation (1) :

$$R = 2 \frac{t_{R(2)} - t_{R(1)}}{\omega_1 + \omega_2} \quad (1)$$

$$R = \frac{1}{4} \sqrt{N_2} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_2}{1 + k_2} \quad (2)$$

a) Montrer, si on admet que les deux pics adjacents ont même largeur à la base ($\omega_1 = \omega_2$), que l'expression (2) est équivalente à (1).

b) La formule suivante permet de calculer le nombre de plateaux effectifs N_{eff} , en fonction de α , pour une résolution donnée R . Retrouver cette expression.

$$N_{\text{eff}} = 16 R^2 \frac{\alpha^2}{(\alpha - 1)^2}$$

Exercice 1.6

Montrer que si l'efficacité N est la même pour deux composés 1 et 2 voisins, l'expression classique de la résolution devient :

$$R = \frac{\sqrt{N}}{2} \frac{k_2 - k_1}{k_1 + k_2 + 2} \quad (1)$$

Montrer qu'en posant $\bar{k} = \frac{k_1 + k_2}{2}$ les expressions (1) et (2) sont équivalentes :

$$R = \frac{1}{2} \sqrt{N} \frac{\alpha - 1}{\alpha + 1} \frac{\bar{k}}{1 + \bar{k}} \quad (2)$$

Exercice 1.7

Un rapport de chromatogramme nous donne :

Largeur à 10 % de la hauteur : 0,085 min, Facteur d'asymétrie : 1,024.

Quelle est la valeur du facteur de traînée ?

Exercice 1.8

On veut déterminer par la méthode de normalisation interne la composition massique d'un échantillon constitué de 4 esters de l'acide butanoïque. Une solution de référence de ces quatre esters (concentrations massiques connues) conduit aux valeurs suivantes des coefficients de réponse relatifs des butanoates de méthyle (ME), d'éthyle (EE) et de propyle (PE) par rapport au butanoate de butyle (BE) :

$$k_{\text{ME/BE}} = 0,919 ; \quad k_{\text{EE/BE}} = 0,913 ; \quad k_{\text{PE/BE}} = 1,06.$$

À partir des indications données en page suivante, fournies par le chromatogramme de l'échantillon à doser, trouver la composition massique de ce mélange.

N° pic	t_R	Composé	Aire (unités arbitraires)
1	2,54	méthyl ester (ME)	2340,1
2	3,47	éthyl ester (EE)	2359,0
3	5,57	propyl ester (PE)	4077,3
4	7,34	butyl ester (BE)	4320,7

Exercice 1.9

Dosage de la sérotonine *S* (5-hydroxytryptamine) par la méthode de l'étalon interne.

On prélève 1 mL de la solution à doser à laquelle on ajoute 1 mL d'une solution contenant 30 ng de *N*-méthylsérotonine (*NMS*). On traite ce mélange pour le débarrasser d'autres composés gênants. On opère par extraction en phase solide pour isoler la sérotonine et son dérivé méthylé, dilués dans une phase convenable.

a) Pourquoi ajoute-t-on le composé d'étalonnage interne avant l'étape d'extraction ?

b) Calculer le facteur de réponse de la sérotonine par rapport à la *N*-méthylsérotonine sachant que le chromatogramme d'étalonnage conduit aux résultats suivants :

- aire sérétonine 30 885 982 $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ quantité injectée : 5 ng
- aire *N*-méthylsérétonine 30 956 727 $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ quantité injectée : 5 ng

À partir du chromatogramme de la solution échantillon, trouver quelle est la concentration en sérotonine dans l'échantillon de départ sachant que l'aire du pic sérétonine vaut 2 573 832 $\mu\text{V} \cdot \text{s}$ et l'aire du pic *N*-méthylsérétonine 1 719 818 $\mu\text{V} \cdot \text{s}$.

Chapitre 2

Chromatographie liquide haute performance

Parmi les techniques chromatographiques dont la phase mobile est un liquide, la chromatographie liquide haute performance (CLHP) est la plus connue. Son champ d'application recouvre une grande partie du domaine de la chromatographie en phase gazeuse auquel s'ajoute celui de l'analyse des composés thermosensibles ou de masses moléculaires à la fois très grandes et même polaires. Son succès est dû à la possibilité d'agir de manière très précise sur la sélectivité entre les composés par le choix de la colonne et de la composition de l'éluant, c'est-à-dire en exploitant les interactions soluté/phase mobile/phase stationnaire. L'efficacité des colonnes est moindre qu'en CPG, mais l'utilisation de phases chirales ou des nouvelles phases stationnaires opérant suivant plusieurs modes, les techniques par appariement d'ions ainsi que d'interaction hydrophobe accroissent encore plus les possibilités de la CLHP. Enfin la miniaturisation de la technique (nanochromatographie) a facilité son association avec la spectrométrie de masse.

2.1 L'ORIGINE DE LA CLHP

La chromatographie liquide haute performance, souvent désignée par son abréviation CLHP – HPLC en anglais –, constitue une technique analytique très générale d'emploi. Elle dérive de la forme la plus ancienne de la chromatographie liquide sur colonne dont les performances, en termes de sélectivité et de résolution, se sont trouvées grandement améliorées par la miniaturisation et l'utilisation de phases stationnaires très élaborées.

Ces phases, constituées de la réunion de micro-particules sphériques dont le diamètre est compris entre 2 et 5 micromètres ou de matériaux monolithiques poreux conduisent à une perte de charge importante dans la colonne. Il faut donc exercer sur la phase mobile une forte pression pour obtenir un débit convenable. Pour marquer cette particularité de la technique, la lettre P du sigle CLHP a pendant longtemps correspondu au mot *pression*.

- La migration forcée d'une phase liquide au contact d'une phase stationnaire se retrouve dans plusieurs techniques chromatographiques. La particularité de la CLHP est de faire intervenir des mécanismes d'échange soluté/phase mobile/phase stationnaire basés sur les coefficients d'adsorption ou de partage.

2.2 CONCEPTION GÉNÉRALE D'UN APPAREIL DE CLHP

Une installation de CLHP comporte divers modules spécialisés, qui se présentent dans des boîtiers distincts ou intégrés dans un même châssis pour des raisons de moindre encombrement (fig. 2.1).

Ces modules sont reliés entre eux par l'intermédiaire de canalisations de très faible diamètre interne (0,1 mm) pour assurer la circulation de la phase mobile. Elles peuvent être en acier inoxydable ou en PEEK® (ou *polyether-etherketone*), un polymère souple et coloré qui résiste aux solvants usuels, même sous des pressions élevées (350 bars).

■ L'écoulement des faibles débits obéit à la loi de Poiseuille. La vitesse de la phase mobile est maximum au centre des canalisations et nulle au contact des parois. Une dispersion des composés se produit donc inévitablement. Pour améliorer les séparations on fait donc en sorte que le volume de phase mobile hors-colonne soit le plus réduit possible (10 % du volume mort de la colonne).

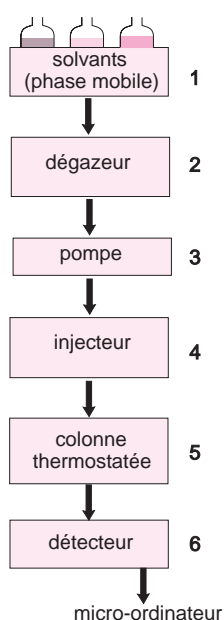


Figure 2.1 Schéma d'une installation de CLHP avec double détection.
Un exemple de réalisation de type modulaire.

L'utilisateur compose son installation en fonction des applications prévues. La présentation en colonne des différents modules est commune à de très nombreux modèles concurrents. Ici le chromatographe modèle HP 1100 (reproduit avec l'autorisation de la société Agilent Technologies), comporte un injecteur automatique permettant un fonctionnement en continu et une colonne thermostatée pour améliorer la reproductibilité des séparations. Les composés élués, après passage par le détecteur UV sont identifiés avec encore plus de certitude au moyen d'un spectromètre de masse (cf. chapitre 16), situé à droite de l'image.

2.3 POMPES ET GRADIENTS D'ÉLUTION

2.3.1 Pompes pour éluants

Toute installation de CLHP comporte au moins une pompe pour forcer le passage de la phase mobile à travers la colonne dont le remplissage est très compact. Il en résulte une pression importante au niveau de l'injecteur. Celle-ci peut atteindre 20 000 kPa (200 bars) selon le débit imposé à la phase mobile ou sa viscosité ainsi que selon la nature de la phase stationnaire.

On utilise des pompes conçues pour maintenir un débit non pulsé et stable, même si la composition de la phase mobile varie. Ces pompes *débitmétriques* comportent généralement deux pistons en série fonctionnant en opposition pour éviter les interruptions de débit dues au remplissage du cylindre (fig. 2.2). Le déplacement des pistons est contrôlé par un moteur pas à pas associé à une came de forme particulière.

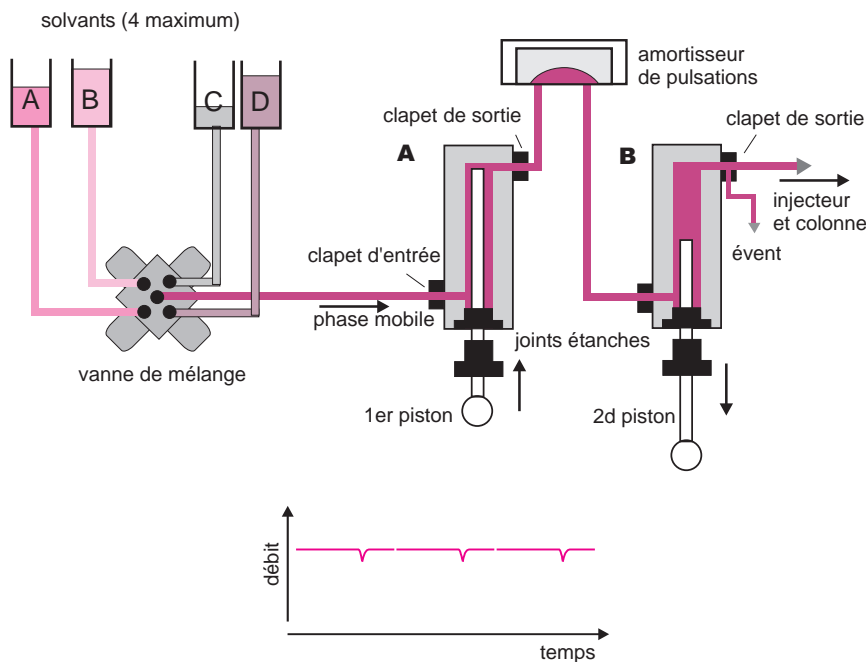


Figure 2.2 Principe de fonctionnement d'une pompe à deux têtes en série.

De manière simplifiée et en ignorant les corrections de compressibilité des solvants, on peut décrire ainsi le cycle de fonctionnement. Partant de l'instant où le clapet de sortie du cylindre A vient de se fermer et le clapet d'entrée vient de s'ouvrir, le piston de A recule pour remplir la chambre A. Pendant ce temps le cylindre B est ouvert et le piston de B avance pour chasser la phase mobile vers la colonne. Le volume déplacé par le piston de B est deux fois plus petit que le volume aspiré par le piston de A. Arrivé au fond de sa course, le clapet d'entrée de A se ferme et le clapet de sortie s'ouvre. Le piston de A avance et chasse le contenu du cylindre A. Ce volume pour moitié est expulsé vers la colonne, l'autre moitié servant à remplir le cylindre B dans sa phase de recul. Entre les deux cylindres est placé un amortisseur de pulsations (dessin réalisé à partir d'un document de la société Agilent-Technologies). (En bas), Variations de débit d'une pompe en fonction des cycles.

■ La présence, dans les solvants, des gaz ambiants (N_2 , O_2 , CO_2 ...), dissous en quantité non négligeable, peut perturber les séparations par modification de la compressibilité des éluants et formation éventuelle de bulles. En outre le dioxygène abrège la vie des colonnes et est gênant pour les détecteurs électrochimiques ou photométriques UV. Il est donc préférable de dégazer les solvants, soit avec des ultrasons soit par barbotage d'hélium, soit par diffusion en les faisant passer dans un long tube de petit diamètre en polymère perméable aux gaz.

Pour parfaire la régulation du débit, on intercale entre la (ou les) pompe(s) et l'injecteur un amortisseur de pulsations fonctionnant suivant le principe mécanique du ballastage. Le montage le plus simple consiste à intercaler dans le circuit de la phase liquide un tube de faible section de plusieurs mètres de long, enroulé sur lui-même. Sous l'effet de l'onde de pression de solvant envoyée par la pompe, le tube se déplie légèrement ce qui augmente son volume interne et par là, contrecarre la variation de pression.

■ Pour obtenir les micro-débits ($1 \mu L/min$, par exemple) nécessaires aux colonnes capillaires remplies, on utilise les mêmes pompes en ajoutant à la sortie un by-pass pour diviser le débit en deux fractions dont seule la plus petite est dirigée vers la colonne.

Par ailleurs pour résister aux pH acides de beaucoup de mélanges d'élution, qui sont d'autant plus corrosifs que la pression est plus grande, les pièces et revêtements au contact de la phase mobile doivent être inertes. Ainsi les pistons ou clapets des pompes sont en téflon ou alliages spéciaux et souvent même en pierres précieuses, saphir ou agate.

Suivant leur conception, les chromatographes comportent une ou plusieurs pompes. Associées à une chambre de mélange située en amont ou en aval, elles permettent de délivrer un éluant de composition fixe (*mode isocratique*) ou au contraire de composition variable pour faire un *gradient d'élution*. Le système doit tenir compte dans ce second cas des différences de compressibilité des solvants, afin que la composition soit respectée à la pression d'utilisation.

2.3.2 Gradients basse-pression ou haute-pression

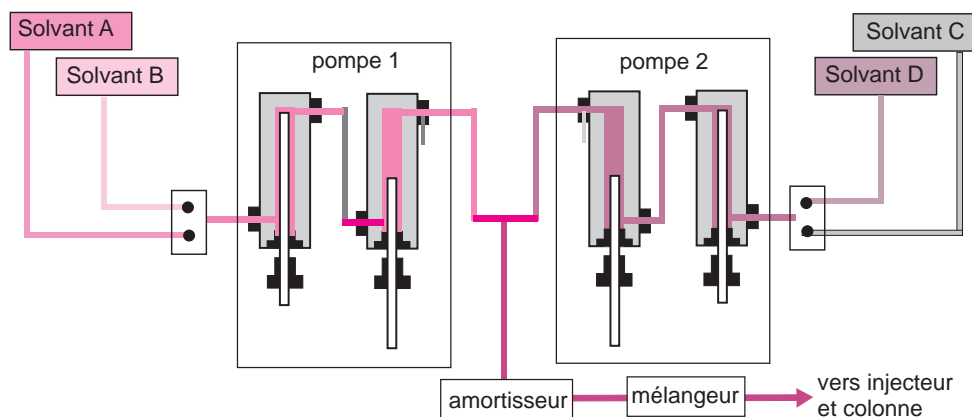


Figure 2.3 Exemple de configuration pour gradient haute pression.

Les pompes sont appelées binaires, ternaires, quaternaires suivant le nombre de solvants qu'elles peuvent mélanger (ici binaires).

Pour réaliser des gradients de phases mobiles, il faut plusieurs solvants. Si l'installation comporte une pompe unique, elle doit être précédée d'une chambre de mélange *basse-pression* dans laquelle des électrovannes font rentrer les différents solvants selon un programme. Par opposition, d'autres installations comportent plusieurs pompes, spécialisées chacune pour un ou deux solvants (pompes binaires), sachant que le mélange final est obtenu sous *haute-pression*, dans une sorte de té placé avant la colonne (fig. 2.3).

■ Lorsqu'on doit enchaîner plusieurs analyses on évite si possible de recourir à l'usage de gradients, en recherchant un compromis de séparation réalisable avec un éluant de composition fixe. On réduit ainsi le temps de post-analyse qui sépare les analyses consécutives. On considère en effet qu'avec un gradient, il faut, pour rééquilibrer les deux phases entre elles avec la composition de départ, faire passer dans la colonne au moins 10 fois le volume mort de l'installation.

2.4 INJECTEURS

L'injection d'un volume précis de l'échantillon en tête de colonne doit se faire en un temps bref afin de perturber le moins possible le régime de circulation de la phase mobile qui doit être stable de la colonne au détecteur. On utilise pour ce faire, une vanne haute pression à plusieurs voies, manuelle ou motorisée dans le cas des injecteurs automatiques, placée juste avant la colonne (fig. 2.4). Il s'agit d'une pièce de précision qui doit résister à des pressions pouvant dépasser 30 000 kPa. Elle fonctionne en deux temps :

- Dans la position *chargement*, où seule la communication entre pompe et colonne est assurée (fig. 2.5), l'échantillon est introduit à pression atmosphérique à l'aide d'une seringue dans un petit volume tubulaire appelé *boucle*. Celle-ci, dont il existe tout un choix de volumes, est soit extérieure, soit intégrée dans le corps de la vanne.
- Dans la position *injection*, l'échantillon est inséré dans le flux de phase mobile par rotation de 60° d'un levier qui permet d'inverser le sens de circulation dans la boucle. Une bonne reproductibilité des volumes n'est atteinte que si la boucle a été totalement remplie par l'échantillon. Le volume prélevé avec la seringue est donc toujours largement supérieur à celui de la boucle.



Figure 2.4 Vanne d'injection pour CLHP et boucles assorties.

Vanne vue de l'arrière (vanne à 6 entrées/sorties avec une boucle raccordée) et assortiment de boucles de différents volumes (reproduit avec l'autorisation de la société Rheodyne Inc.).

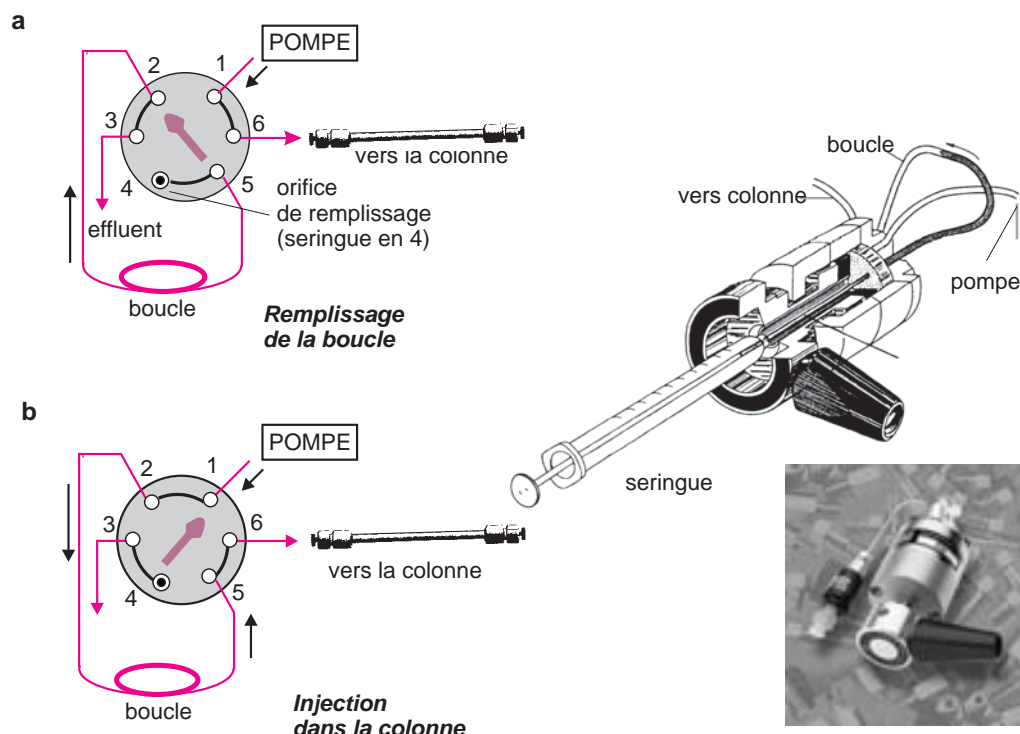


Figure 2.5 Injection avec une boucle.

a) Remplissage de la boucle. Dans cette étape, la seringue est introduite à la position n° 4 ; b) injection dans la colonne (noter la nouvelle position de la manette). Vanne modèle 7125. Les vannes sont motorisables (reproduit avec l'autorisation de la société Rheodyne Inc.)

2.5 COLONNES

La colonne se présente comme un tube, le plus souvent en acier, dont la longueur et le diamètre présentent des différences selon les modèles. Les colonnes « standard » dont le diamètre interne (DI) est d'environ 4,5 mm et la longueur de 10 cm (fig. 2.6), sont de plus en plus supplantées par des colonnes de plus faibles diamètres, baptisées *narrow-bore* (DI 2-4 mm), *micro-bore* (DI 1-2 mm), *capillaires remplies* (DI 0,1-1 mm). Ces modèles sont apparus suite à l'évolution des phases stationnaires customisées et pour simplifier les problèmes de couplage avec la spectrométrie de masse (technique couplée CLHP/SM, cf. chapitre 16).

■ Toute application en chromatographie correspond avant tout à une séparation. La colonne doit donc avoir une efficacité suffisante, sans pour autant qu'il soit utile d'avoir des performances plus que nécessaires. Une colonne courte permettra d'aller plus vite. Une colonne étroite se traduira par une économie de phase mobile. Ainsi pour une colonne standard, le débit est de l'ordre de 1 mL/min, alors qu'il tombe à quelques $\mu\text{L}/\text{min}$ pour une colonne micro-bore, ce qui nécessite des pompes et des détecteurs adaptés – quelques gouttes suffisant pour éluer tous les composés.

La colonne est souvent précédée d'une précolonne, dite *colonne de garde*, courte (0,4 à 1 cm), remplie de la même phase stationnaire, ce qui sert à retenir certaines impuretés (fig. 2.6). On augmente ainsi la durée de vie de la colonne principale en préservant ses performances.

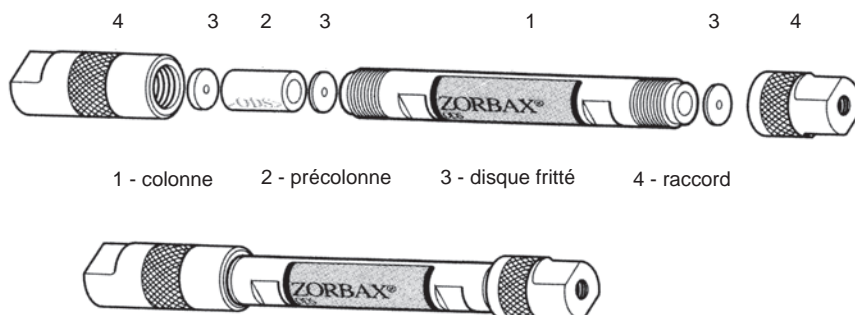


Figure 2.6 Colonne standard et précolonne de CLHP.

Aspects extérieurs éclatés et assemblés d'une colonne ZORBAX®. La phase stationnaire est maintenue par deux disques poreux situés à ses extrémités. La surface interne du tube est rendue inerte par un traitement de passivation, ou par un chemisage de verre ou de polymère PEEK®. La précolonne, périodiquement changée, évite le colmatage de la colonne. Il n'empêche qu'il est conseillé de faire passer les échantillons avant analyse à travers un filtre de porosité inférieure à 0,5 μm (reproduit avec l'autorisation de la société RTI).

■ Les écarts de température modifiant les temps de rétention, les appareils actuels permettent de thermostatier la colonne et l'éluant, à la fois pour assurer la répétabilité des analyses et pour faire intervenir éventuellement la température comme paramètre de séparation (fig. 2.7).

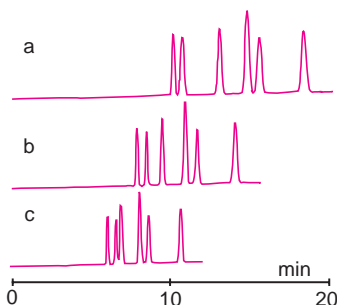


Figure 2.7 Effet de la température de la colonne sur une séparation.

Exemple relatif à trois essais effectués sur un même mélange et avec un même débit de phase mobile à des températures différentes (a) 25 °C, (b) 35 °C et (c) 45 °C.

2.6 PHASES STATIONNAIRES

La recherche d'une bonne résolution chromatographique et par voie de conséquence d'une efficacité élevée, a conduit à la création de phases stationnaires de nature et de structures variées. Pour raccourcir les temps d'analyse, il faut tenter d'accélérer dans la colonne les transferts entre les phases mobile et fixe.

2.6.1 Le gel de silice, matière de base des phases actuelles

Parmi tous les matériaux qui ont été ou sont actuellement utilisés pour la confection des phases stationnaires, le *gel de silice* tient une place prépondérante.

Ce matériau de base est un solide amorphe ayant pour formule de composition $\text{SiO}_2(\text{H}_2\text{O})_n$ (avec n très proche de 0). Il est tout à fait différent de la silice naturelle cristalline (SiO_2) qui n'est qu'un précurseur très éloigné de sa préparation. Cette dernière fait appel à des procédés de polymérisation *sol-gel* d'un tétraalcoxysilane (ex. tétraéthoxysilane) au sein d'un liquide, sous l'effet d'une hydrolyse catalysée (fig. 2.8).

Le gel de silice n'a pas la structure ordonnée de la silice cristalline, mais il reste néanmoins bâti autour de l'agencement tétraédrique des quatre liaisons issues de l'atome de silicium. C'est un polymère inorganique réticulé. Il comporte des *groupements silanols*, Si-OH en nombre variable, qui ont résisté à la phase finale de déshydratation thermique. Ces groupements sont responsables des propriétés catalytiques acides de ce matériau très polaire car Si-OH a un pK de 10, comparable à celui du phénol. Leur concentration peut être établie par RMN du ^{29}Si ou par analyse centésimale du carbone pour les phases greffées (cf. plus loin).

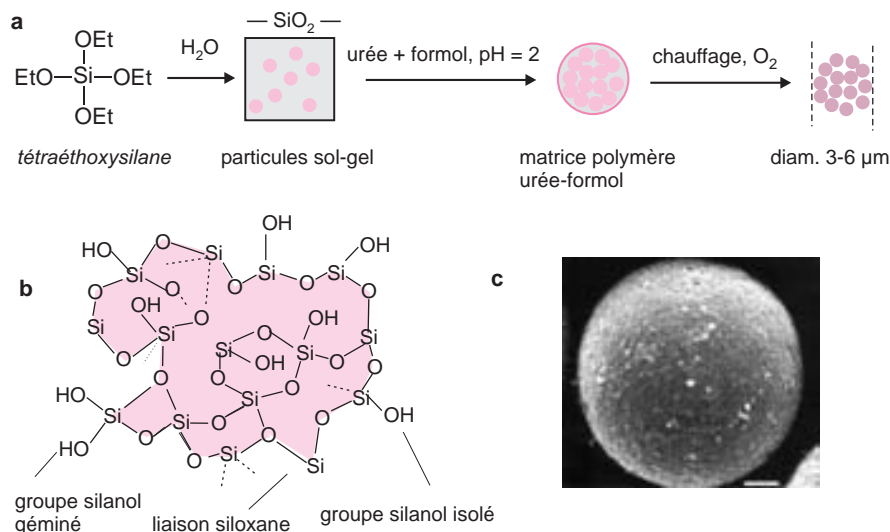


Figure 2.8 Le gel de silice pour chromatographie.

a) préparation de grains sphériques de gel de silice via un sol-gel. La dispersion, appelée sol, constituée de particules sphériques de quelques nm de diamètre, s'agglutine en présence d'un liant organique urée/formol jusqu'à atteindre la taille voulue (3-7 μm). Le traitement final consiste en une pyrolyse pour éliminer la matrice organique. b) représentation du réseau, correspondant à un maillage tridimensionnel, d'un gel de silice porteur de groupements silanols. c) image d'une particule sphérique de gel de silice issu d'un assemblage compact de sphères submicroniques.

Le gel de silice comporte des pores de tailles différentes. Pour remplir la colonne d'une manière homogène, il est préparé sous forme, soit de microparticules sphériques, soit d'un monolithe poreux (fig. 2.9 et 2.11). Il est nécessaire en effet d'éviter la formation de chemins préférentiels pour la phase mobile et par suite pour les composés qui y sont dissous.

- Les micro-sphères ont un diamètre constant dans une même colonne mais il en existe plusieurs types allant de 1 à 12 μm .
- Les monolithes, apparus plus récemment, sont ainsi nommés parce qu'il s'agit d'un gel de silice formé d'une seule pièce dans la colonne même. La reproductibilité des caractéristiques de ce second type de colonne est plus difficile à maîtriser.

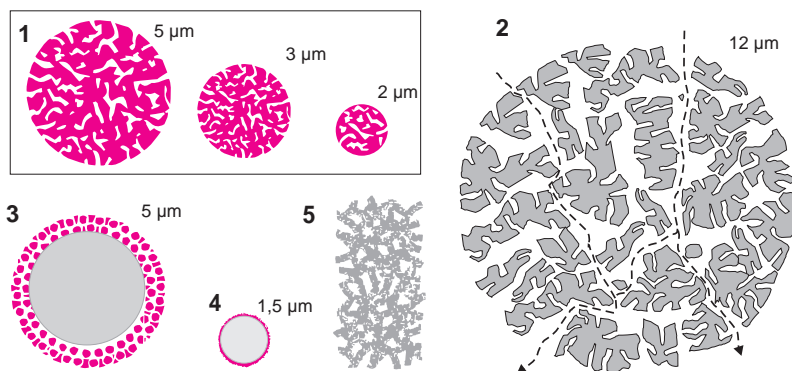


Figure 2.9 Représentations imagées de quelques types de gels de silice (porosité et dimensions).

1- structure comportant des pores de diffusion répartis dans la totalité de la particule. 2- structure comportant des fissures de perfusion pour accélérer le processus de transfert. 3 et 4- Particules poreuses en surface avec un noyau non poreux. 5- détail de structure d'un remplissage du type monolithique.

■ L'emploi de particules de très faible diamètre ($< 2 \mu\text{m}$) augmente la surface de contact et diminue l'HEPT, mais produit une perte de charge beaucoup plus importante que pour les plus grosses particules. On est donc amené à réduire la longueur de la colonne, ce qui va à l'encontre des performances. On gagne cependant en temps d'analyse. Les phases monolithiques offrent une alternative intéressante à la fois parce que la perte de charge est beaucoup plus faible et que les performances ne sont pas altérées par des débits élevés (fig. 2.10).

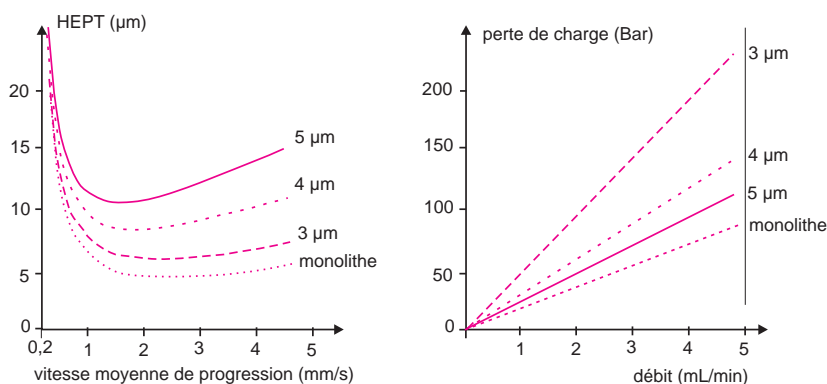


Figure 2.10 Nature de la phase stationnaire et efficacité.

L'HEPT décroît avec la taille des particules, mais à débit identique la perte de charge augmente. Les colonnes monolithiques améliorant les transferts de masse entre les phases, apparaissent supérieures. Essais réalisés avec des colonnes de 5 cm remplies d'une phase stationnaire RP-18 de même fabrication et en prenant le naphthalène comme composé test

Les propriétés des gels de silice dépendent de nombreux paramètres : *structure interne*, *porosité ouverte* (dimension et répartition des pores), *surface spécifique*, *résistance à l'écrasement* et *polarité*. Les gels de silice courants comportent environ 5 groupes silanols par μm^2 . La surface spécifique est de l'ordre de $350 \text{ m}^2/\text{g}$ avec des pores de 10 nm. Pour les particules sphériques, la porosité mesurée par le volume de phase mobile dans la colonne varie de 30 à 70 % du volume total de la colonne. Pour les colonnes monolithiques elle atteint 90 %, ce qui conduit à une perte de charge plus faible et autorise donc des débits plus importants (fig. 2.10). On est bien loin des phases utilisées au début du siècle par Tswett, constituées de craie ou de sucre en poudre. Le traitement subi par la silice en fait plutôt une sorte de « sable magique ».

■ La préparation du gel de silice sous forme de grains irréguliers, utilisé en chromatographie préparative, fait appel à un procédé hydrothermal : on forme d'abord l'acide orthosilicique, composé instable, $[\text{Si}(\text{OH})_4]$ 1 par acidification du silicate de sodium $[\text{Na}_2\text{SiO}_3]$ encore appelé « liqueur de cailloux », ou water-glass, lui-même issu de certains sables très purs par fusion alcaline. 1 donne d'abord un dimère 2 qui continue à se polycondenser progressivement en particules colloïdales à surface hydroxylée. On obtient par agrégation un hydrogel de silice gélatineux dont la calcination conduit à des grains de gel de silice dense (xerogel).

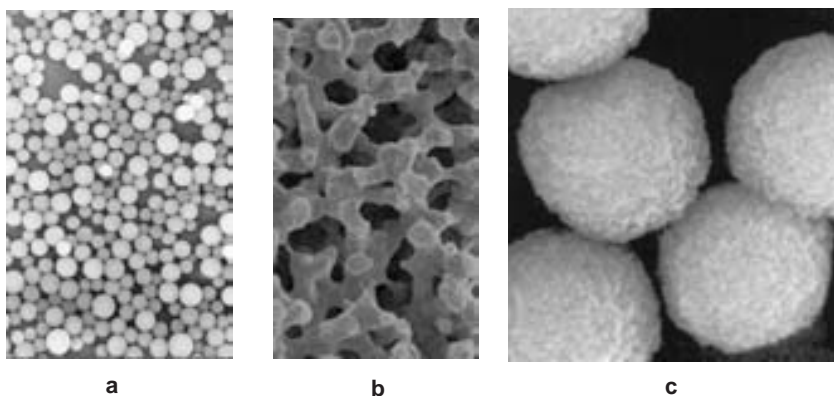


Figure 2.11 Le gel de silice pour chromatographie.

a) microsphères de taille homogène ; b) structure macroporeuse d'une colonne monolithique ; c) particules de silice à noyau dur et poreuse en surface.

■ Le mécanisme d'action du gel de silice repose sur l'adsorption (fig. 2.12), phénomène qui consiste en l'accumulation d'un composé à l'interface entre deux phases. Dans les cas les plus simples, il y a formation d'une monocouche (isotherme de Langmuir), mais souvent il se crée aussi une attraction entre les molécules déjà adsorbées et celles qui sont restées en solution. C'est la raison principale de la non-symétrie des pics d'élution. D'autres théories expliquent le phénomène de séparation des constituants par un simple ralentissement (sans immobilisation) au niveau de l'interface PM/PS qui diffère pour chaque analyte.

2.6.2 Les silices greffées

Bien qu'ayant une capacité d'adsorption élevée, le gel de silice décrit précédemment n'est plus utilisé tel quel en chromatographie analytique. Hydrophile par nature, ses caractéristiques évoluent au cours du temps, entraînant un manque de reproductibilité des séparations.

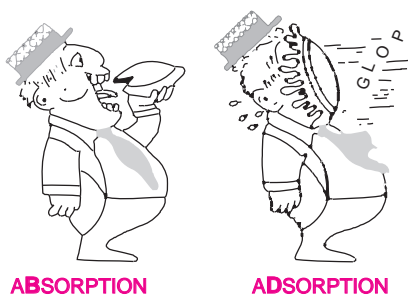


Figure 2.12 Phénomènes d'adsorption et de partage.

L'adsorption est un phénomène d'interface à la différence de l'absorption (reproduit avec l'autorisation de M. Laguës, *L'Actualité Chimique* 1990, (1) p.17.

Pour diminuer sa polarité jugée excessive dans de nombreux cas on le rend essentiellement hydrophobe.

Les modifications classiques mettent à profit la réactivité des fonctions silanols présentes en surface pour fixer des molécules organiques par des liaisons covalentes. Le gel de silice ainsi modifié devient assimilable à un liquide immobilisé, la séparation mettant en jeu les *coefficients de partage* et non plus les *coefficients d'adsorption*. Ces phases greffées, dont la polarité peut être ajustée avec précision, sont à l'origine de la *chromatographie de partage à polarité de phase inversée*, utilisée dans quasiment toutes les séparations.

Ces modifications de la surface du gel conduisent à deux types de phases.

Phases monomériques (10–15 μm d'épaisseur). Elles sont obtenues en faisant réagir un monochlorosilane en présence d'une base sur les fonctions silanols de surface (fig. 2.13). On prépare ainsi les phases classiques RP-8 (groupement diméthyl-octylsilane) et RP-18 (groupement diméthyl-octadécylsilane, ou ODS). Une fraction des groupements Si-OH demeure cependant intacte. Elle peut être la cause d'interactions polaires gênantes. D'autres réactifs silylés tels le chlorotriméthylsilane (ClSiMe_3) ou l'hexaméthyl-disilazane ($\text{Me}_3\text{SiNHSiMe}_3$), conduisent à une réaction plus complète. Les quelques sites restants non transformés, car inaccessibles au réactif, le sont également aux analytes.

Phases polymériques (25 μm ou plus en épaisseur). On utilise cette fois un di- ou trichlorosilane en présence de vapeur d'eau qui provoque une polymérisation en solution du réactif avant dépôt et greffage sur la silice. On obtient ainsi une couche polymérique réticulée.

L'architecture finale du revêtement est difficile à se représenter. Mono- ou multicouche, sa représentation à l'échelle moléculaire relève plutôt de la spéculation.

2.6.3 Autres phases à polarités variées

Les gels de silice précédents, comportant des greffons alkyles à 8 ou 18 atomes de carbone, sont polyvalents et par conséquent très utilisés (65 % des applications), mais pour améliorer la séparation de certaines classes de composés, il est fait appel à des phases stationnaires spécifiques. Sur une âme de silice, sont fixés des ligands porteurs de fonctions (groupements aminopropyle, cyanopropyle, benzyle) ou des greffons dipolaires (zwitterions) pour conférer une polarité intermédiaire à la phase stationnaire. La séparation des mélanges comportant à la fois des constituants polaires et non polaires, qui exigent des phases mobiles riches

en eau, s'en trouve améliorée. Les sucres, les peptides et autres composés hydrophiles deviennent séparables (voir figure 2.16).

Le gel de silice, à son tour, peut être remplacé par l'alumine ou l'oxyde de zirconium (ZrO_2) comme supports de dépôts réticulés à base de polybutadiène ou d'autres polymères styrène/divinylbenzène ou hydroxyméthylstyrène. Ces phases stationnaires présentent une meilleure stabilité en milieu basique ou acide, certaines colonnes pouvant être rincées à la soude 1M, ce que ne supportent pas les liaisons Si-O-C . Signalons enfin que le graphite poreux sous forme de sphères dont la surface est 100 % carbone, donc totalement hydrophobe, a reçu des applications pour les composés ayant des facteurs de rétention élevés.

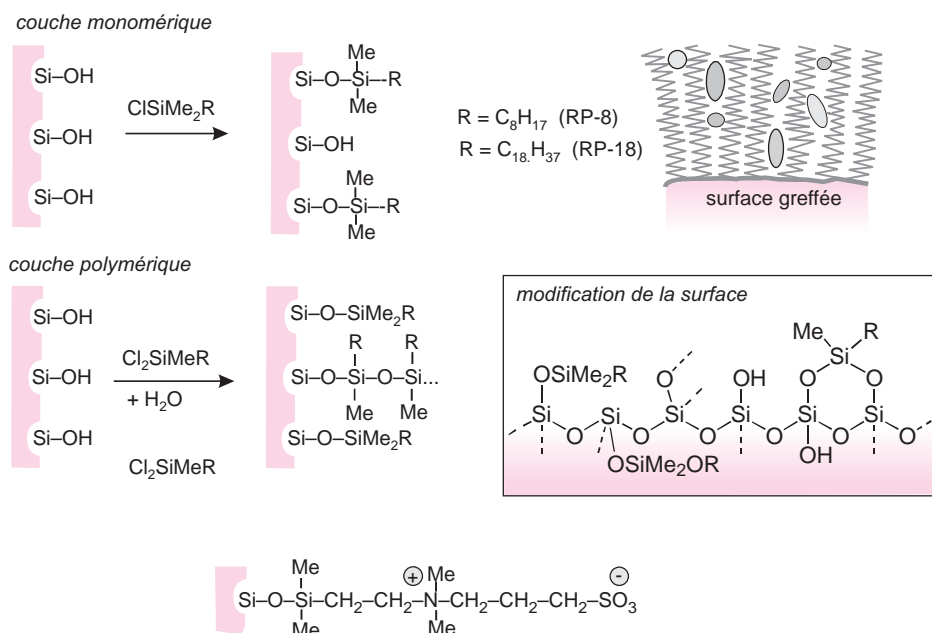


Figure 2.13 Formation d'organosilanes greffés à l'interface du gel de silice. Représentation de quelques groupements monomériques ou polymériques rencontrés en surface du gel de silice. Détail d'une particule chevelue. L'enchaînement Si-O-Si-C est plus stable que Si-O-C . On peut atteindre, pour les revêtements polymériques, plus de 15 % de carbone après greffage sur les silanols accessibles. En bas, un exemple de phase comportant un greffon dipolaire. D'autres réactions sont aussi utilisées (hydrosilylation en particulier).

2.7 CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE CHIRALE

Un composé moléculaire organique dont la formule développée révèle l'existence d'un centre d'asymétrie, conduit généralement à notre échelle, dite macroscopique, à un mélange en quantités variables des deux énantiomères possibles R et S. Si on chromatographie ce composé sur une colonne dont la phase stationnaire est chirale, c'est-à-dire possédant des centres d'asymétrie identiques et correspondant à un seul énantiomère (R ou S), on observe sur le chromatogramme deux pics (fig. 2.14). Ces pics résultent des interactions réversibles

notées ici R (composé)/R(phase stat.) et S (composé)/R (phase stat.) dont les stabilités sont légèrement différentes. Les aires sont proportionnelles à l'abondance de chacune des deux formes R et S.

Actuellement on utilise principalement des résines optiquement actives ou des gels de silice greffés avec des cyclodextrines (enchaînements cycliques de 5 à 7 molécules de glucose) par l'intermédiaire d'un « bras » ayant plusieurs atomes de carbone (fig. 2.14). Ces molécules de forme cylindrique présentent une cavité hydrophobe tandis que la paroi externe est hydrophile. Ces phases ont la particularité de permettre l'inclusion sélective d'une grande variété de composés qui conduisent en surface à des complexes diastéréoisomères réversibles.

On appelle **pureté optique** de l'analyte, son excès énantiomérique (e.e), calculé à partir de la relation suivante où S_R et S_S désignent les aires des pics des deux énantiomères :

$$\text{Pureté optique (e.e. \%)} = 100 \frac{|S_R - S_S|}{S_R + S_S}$$

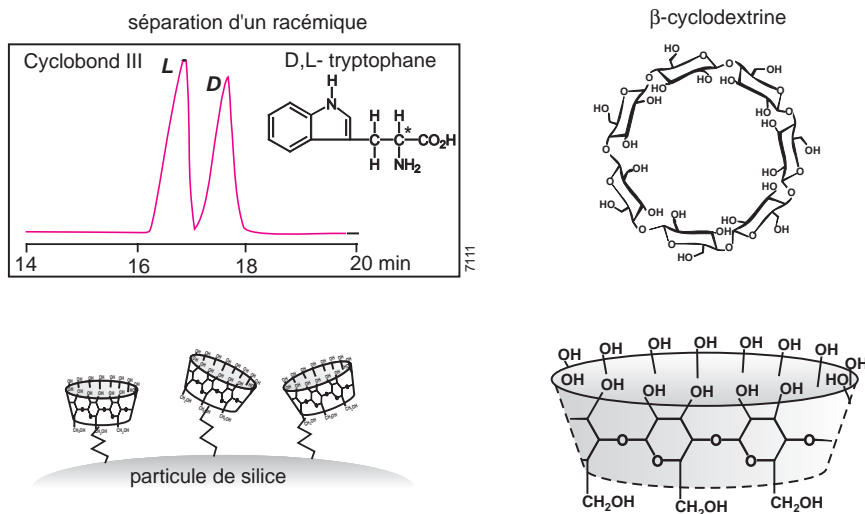


Figure 2.14 Séparation d'un racémate sur phase stationnaire chirale.

Chromatogramme d'un composé à l'état de mélange 50/50 des deux formes R et S (adapté d'un document Alltech); formule développée de la β -cyclodextrine et aspect dans l'espace (diamètre 1,5 nm, trou 0,8 nm, hauteur 0,8 nm); représentation partielle d'une sphère de gel de silice greffée avec une cyclodextrine par l'intermédiaire d'un bras extenseur.

2.8 PHASES MOBILES

Suivant un principe général, à une phase stationnaire polaire on oppose une phase mobile peu ou pas polaire et vice-versa. La chromatographie est dite *en phase normale* dans le premier cas et à *polarité de phase inversée* (« R – HPLC »). dans le second.

Sachant que la plupart des applications actuelles font appel à des gels de silice transformés, peu polaires, de nature plutôt hydrophobe, on choisit comme phases mobiles des mélanges d'eau et d'un modifiant tel le méthanol ou l'acétonitrile. En changeant la composition de la phase mobile, donc sa polarité, on agit par l'intermédiaire des coefficients de distribution K (C_S/C_M) sur les facteurs de rétention k des composés (fig. 2.15). La difficulté pour le chromatographe est de faire le bon choix en fonction des composés à séparer (fig. 2.16).

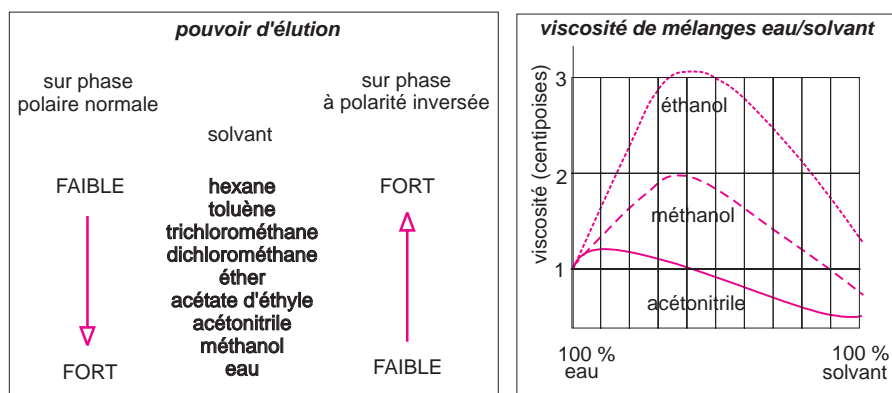


Figure 2.15 « Force » des solvants utilisés comme phases mobiles.

On peut, en mélangeant plusieurs solvants, ajuster le pouvoir d'élution de la phase mobile. On notera que la viscosité, donc la pression en tête de colonne varie selon la composition de la phase mobile.

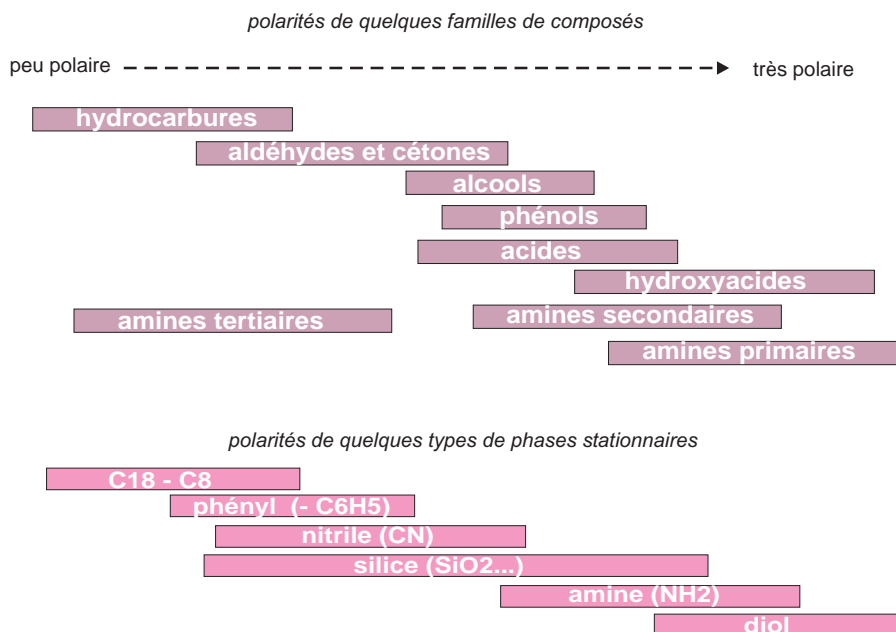


Figure 2.16 Polarités de quelques familles de composés organiques ainsi que des principaux types de greffons des phases stationnaires actuelles.

Avec une phase stationnaire dont la partie active ressemble à une couche paraffinique, l'ordre d'élution est opposé à celui auquel on est habitué avec les phases normales. Ainsi avec un éluant polaire, un composé polaire migre plus vite qu'un composé apolaire. Dans ces conditions les hydrocarbures sont fortement retenus. En revanche, les composés polaires sont assez difficiles à séparer entre eux. Il faut réaliser des gradients d'élution en diminuant progressivement au cours du temps la concentration en eau (polaire) au profit du modifiant choisi (moins polaire). On commencera par exemple avec un mélange 80/20 % eau/acétonitrile pour terminer à la composition de 40/60 %. C'est le domaine de la chromatographie d'interaction hydrophile.

■ On reconnaît quatre types d'interactions entre les molécules de solvant et de soluté :

- ionique quand soluté et solvant ont tous deux des moments dipolaires ;
- de dispersion due à l'attraction entre elles des molécules voisines ;
- diélectriques, qui favorisent la dissolution des solutés ioniques dans les solvants polaires ;
- par liaisons hydrogène, quand sont réunis un soluté et un solvant dont l'un est donneur et l'autre accepteur de protons.

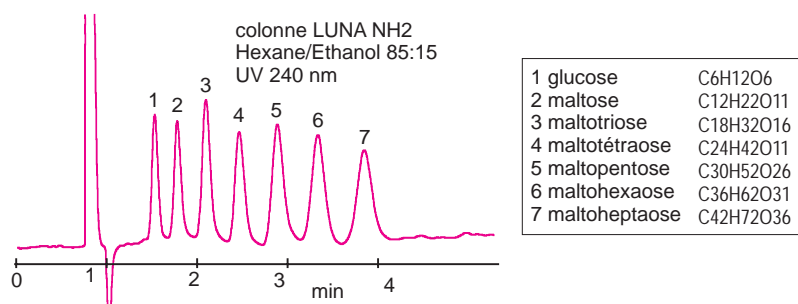


Figure 2.17 Séparation de sucres sur une phase « amine ».

L'ordre d'élution des 7 sucres homologues nous indique que la phase stationnaire est polaire et que le pouvoir d'élution de la phase mobile diminue d'autant plus que la masse moléculaire est plus grande.

■ La séparation des composés très polaires sur les phases stationnaires de type RP-18 impose l'usage d'une phase mobile très riche en eau. Dans ces conditions, il arrive que la phase stationnaire, qui est hydrophobe, devienne subitement non mouillable. La séparation devient mauvaise. C'est pourquoi on choisit de préférence des phases présentant une polarité résiduelle pour maintenir l'interaction entre les analytes et l'eau de la phase mobile (fig. 2.17).

2.9 CHROMATOGRAPHIE D'APPARIEMENT D'IONS

La chromatographie par appariement d'ions (PIC, *paired ion chromatography*) permet d'améliorer la séparation des composés ioniques ou très polaires quand on décide d'utiliser une colonne apolaire sur laquelle ces composés ont trop peu d'affinité (fig. 2.18). Pour augmenter leur temps de rétention, on doit diminuer leur caractère ionique. Il suffit, pour certains, de modifier le pH, mais pour d'autres, on ajoute à la phase mobile un composé porteur à la fois d'une chaîne carbonée (peu polaire) et d'un groupement de charge opposée

à celle du composé à séparer (alkylammonium ou alkylsulfonate). Ceci conduit à des d'ions globalement neutres, assez stables. De la sorte, il devient possible de séparer des cations et des anions inorganiques avec une colonne remplie de polarité inversée.

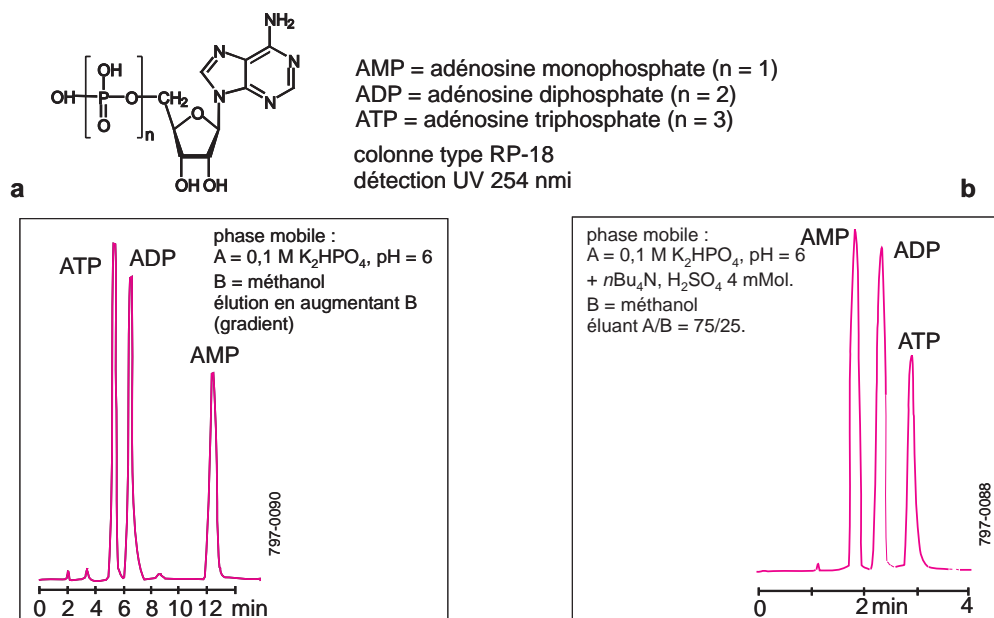


Figure 2.18 Effet de l'appariement d'ions sur une séparation avec une colonne à polarité inversée. Le chromatogramme d'un mélange de 3 nucléotides montre en a la situation normale avec une élution dans l'ordre des polarités décroissantes; en b, par contre, situation inversée : l'ATP associé à l'ion tétrabutylammonium est devenu plus lipophile, et est donc plus longtemps retenu (adapté d'un document Alltech).

2.10 CHROMATOGRAPHIE D'INTERACTION HYDROPHOBE

La chromatographie à interaction hydrophobe (HIC, *hydrophobic interaction chromatography*) permet d'améliorer la séparation des composés bioorganiques tels les protéines solubles dans l'eau. On choisit une colonne apolaire et on commence l'élution avec une phase mobile fortement saline (sulfate d'ammonium 2 M et phosphate monosodique 0,1 M, à pH 7). Dans ces conditions les protéines se fixent par leurs domaines hydrophobes sur la PS. Ensuite on diminue progressivement la concentration saline afin que les protéines repassent dans la phase mobile (fig. 2.19). Ainsi elles sont éluées dans l'ordre décroissant de leur caractère hydrophile.

■ Cette opération rappelle une technique expérimentale connue en chimie organique : quand, dans une ampoule à décanter, on veut extraire avec de l'éther un composé organique au sein d'une phase aqueuse, on ajoute de la saumure pour faire reculer la solubilité du composé organique dans l'eau donc faciliter son extraction par l'éther.

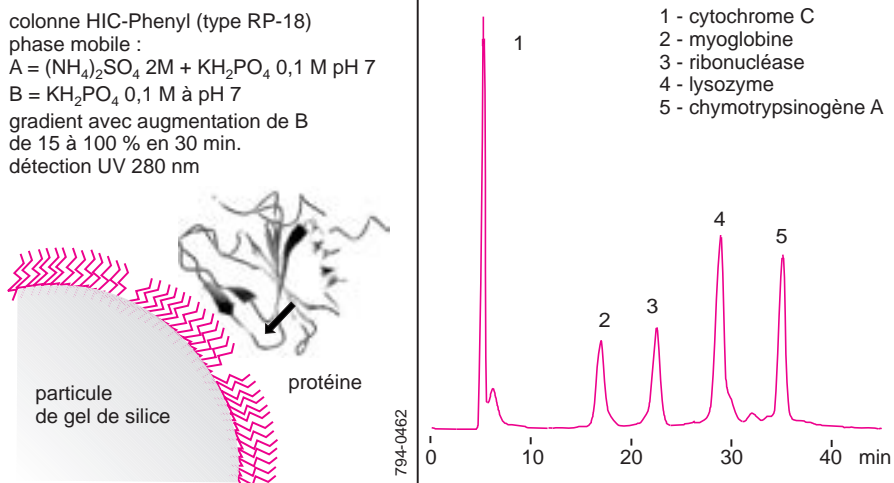


Figure 2.19 Séparation améliorée sur le principe de l'interaction hydrophobe. Chromatogramme d'un mélange de protéines de moins en moins hydrophiles, obtenu en diminuant au cours du temps la concentration saline (reproduit avec l'autorisation de la société Supelco).

2.11 PRINCIPAUX DÉTECTEURS

L'analyse par chromatographie a rarement pour but de déterminer la composition totale de l'échantillon, mais plutôt de repérer la présence ou doser un composé présent, pour lequel on a choisi un détecteur bien adapté. Le détecteur universel n'est donc pas indispensable. Dans certains cas, il peut même être un handicap pour la lisibilité du chromatogramme. Plus nettement encore qu'en CPG, les aires relatives des pics d'un chromatogramme n'ont souvent aucun rapport avec la composition molaire ou massique du mélange analysé.

Cependant quel qu'il soit, le détecteur doit réunir un certain nombre de qualités : donner pour chaque composé détecté une réponse proportionnelle à sa concentration instantanée, être sensible et avoir peu de bruit de fond, être stable dans le temps.

Les modes de détection les plus courants reposent sur les propriétés optiques des composés : absorption, fluorescence et indice de réfraction.

2.11.1 Détecteurs spectrophotométriques

La détection est basée sur la loi de Lambert-Beer ($A = \varepsilon_\lambda \ell c$) : l'absorbance A de la phase mobile est mesurée en sortie de colonne, à la longueur d'onde λ ou plusieurs longueurs d'onde dans l'UV ou le visible (cf. chapitre 9). La phase mobile ne doit pas, ou très peu, absorber par elle-même (fig. 2.20). L'intensité de l'absorption dépend du coefficient d'absorption molaire ε_λ , ce qui rend impossible, par la simple observation d'un chromatogramme, de se faire une idée de la concentration des espèces repérées, même de manière très approximative.

La détection UV correspond donc à une détection sélective. Pour les composés qui n'ont pas de spectre d'absorption exploitable, on fait appel à la « dérivation » post-colonne des analytes.

Détection monochromatique. Le modèle de base se compose d'une source au deutérium ou à vapeur de mercure, d'un monochromateur pour isoler une bande passante étroite (10 nm) ou une raie (ex. la raie 254 nm du Hg), d'une cellule à circulation d'un volume de quelques μL (trajet optique de 0,1 à 1 cm) et d'un moyen de détection optique.

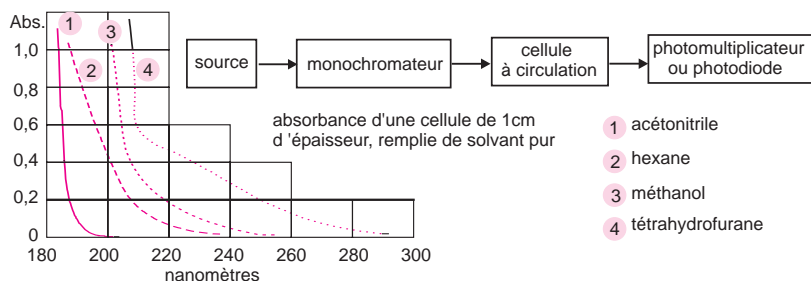


Figure 2.20 Détection photométrique.

Principe d'un détecteur photométrique à une seule longueur d'onde et spectres d'absorption de quelques solvants utilisés en chromatographie liquide. On considère que la limite de transparence d'un solvant correspond à une absorbance de 0,2 pour 1 cm d'épaisseur traversée.

■ L'essor actuel des biotechnologies, comme de la biochimie, a accru la demande d'analyse des acides aminés (hydrolysats de protéines) ; on peut utiliser les détecteurs photométriques à condition de réaliser avant passage dans la cellule de mesure une réaction post-colonne avec la ninhydrine par exemple (cf. chapitre 8).

Détection polychromatique. Les détecteurs plus perfectionnés permettent soit d'enregistrer l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde quasi-simultanément, soit de capter en une fraction de seconde tout un domaine de longueurs d'onde sans interrompre la circulation dans la colonne (fig. 2.21 à 2.23).

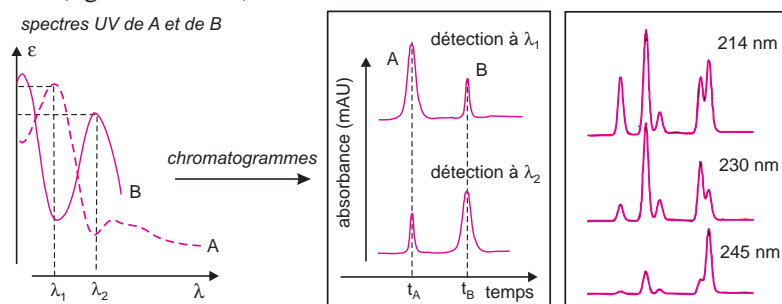


Figure 2.21 Chromatographie d'un échantillon contenant 2 composés A et B, dont les spectres UV sont différents.

Selon le choix de la longueur d'onde de détection, le chromatogramme n'aura pas le même aspect. Les chromatogrammes (à droite) d'un mélange de quelques pesticides enregistrés à trois longueurs d'onde différentes illustrent ce phénomène. En analyse quantitative, on doit donc déterminer d'abord les facteurs de réponse du détecteur pour tous les composés analysés (cf. analyse quantitative, Chap. 1).

Le détecteur à barrette de diodes permet non seulement d'obtenir un chromatogramme, mais il fournit des renseignements spectraux pouvant servir à s'assurer de l'identité des composés séparés (fig. 2.22). C'est ce qu'on nomme *l'analyse de certitude* (cf. ch. 9).

Les détecteurs spectrophotométriques peuvent être utilisés en mode gradient d'éluion.

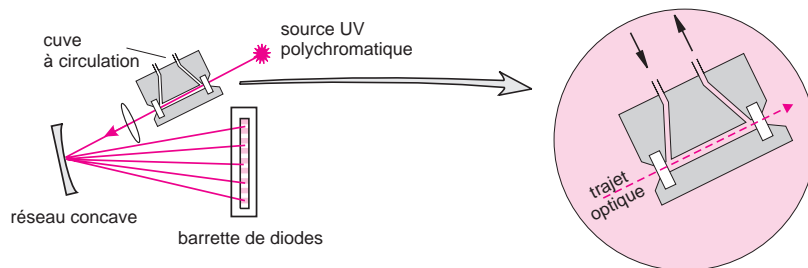


Figure 2.22 Principe du détecteur à barrette de diodes.

La cellule de mesure est éclairée par une source polychromatique dans le proche UV/Vis. La lumière transmise par l'échantillon est dispersée par un réseau à réflexion sur un détecteur constitué par une rangée de diodes (plusieurs centaines), chacune permettant de connaître l'absorbance moyenne sur un intervalle très étroit de longueur d'onde (ex. 1 nm).

■ Les spectres successifs des composés élués par la phase mobile, captés en sortie de colonne, sont tout d'abord mis en mémoire par l'instrument au fur et à mesure de l'éluion, pour être traités ultérieurement par un logiciel adapté. On obtient des spectrochromatogrammes souvent spectaculaires (fig. 2.23). Cette acquisition d'un grand nombre de spectres pour une seule analyse accroît les potentialités de ces détecteurs qui se prêtent à de multiples usages, telle la représentation topographique de la séparation effectuée, $A = f(\lambda, t)$ (diagrammes d'isoabsorption).

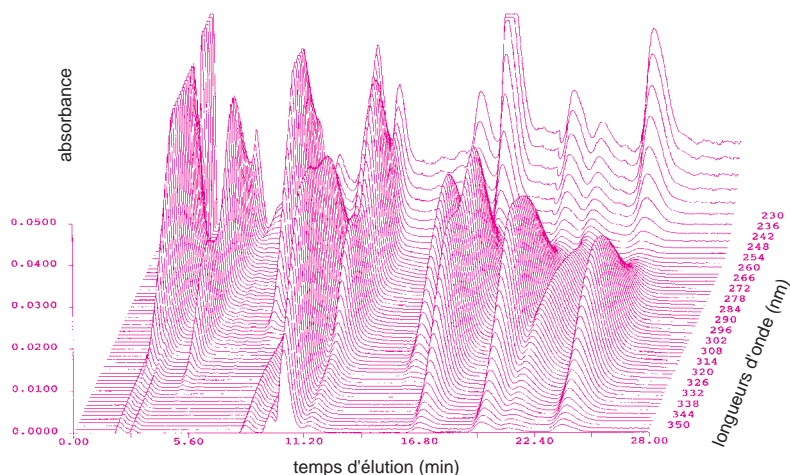


Figure 2.23 – Représentation sous forme tridimensionnel, $A = f(t, \lambda)$, d'une séparation chromatographique obtenue par une méthode d'enregistrement rapide (reproduit avec l'autorisation de la société TSP instruments).

2.11.2 Détecteur spectrofluorimétrique

Les composés fluorescents réémettent sous forme de radiations lumineuses une fraction plus ou moins grande du rayonnement de la source auquel ils sont soumis (cf. ch. 11).

L'intensité de fluorescence est proportionnelle à la concentration de la substance à condition que celle-ci reste faible. Les détecteurs de fluorescence (fig. 2.24) à la fois sensibles et sélectifs sont utilisables pour les composés naturellement fluorescents et pour tous ceux qui peuvent le devenir par traitement préalable à la détection. Dans ce dernier cas on fait appel aux procédés de dérivation pré- ou post-colonne : un automate placé soit avant la colonne soit entre la colonne et le détecteur effectue une ou plusieurs réactions sur les composés afin de les rendre fluorescents.

■ En suivant ce principe, on dose les traces de carbamates (pesticides) dans l'environnement, par saponification avec de la soude puis réaction sur l'aldéhyde *o*-phtalique, pour transformer la méthylamine en un dérivé fluorescent (fig. 2.24).

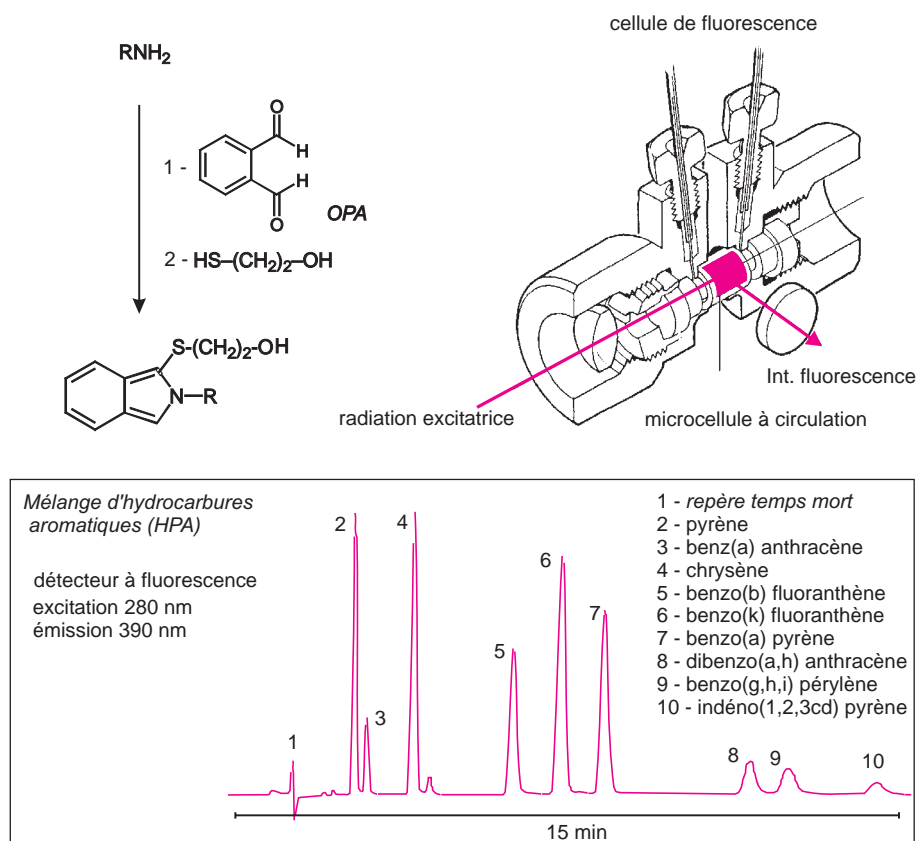


Figure 2.24 Détection fluorimétrique.

Exemple de réactifs utilisés pour rendre fluorescents les amines primaires par action de l'OPA en présence de monothiolglycol. Détail d'une cellule à circulation pour détecter la fluorescence. Dans la pratique, la fluorescence est observée dans une direction perpendiculaire à la direction de l'excitation (reproduit avec l'autorisation de la société Hewlett-Packard). Chromatogramme d'un mélange de quelques hydrocarbures polynucléaires aromatiques (HPA). L'intensité de fluorescence varie énormément d'un composé à un autre, à la fois parce que la longueur d'onde d'excitation devrait être ajustée pour chaque composé et que l'intensité de fluorescence varie également. Il existe des détecteurs programmables pour obtenir une réponse optimale.

2.11.3 Détecteur réfractométrique

Ce type de détecteur comporte un réfractomètre différentiel qui a pour objet de mesurer en continu la différence d'indice de réfraction entre la phase mobile et l'effluent de la colonne. Pour cela un faisceau lumineux (mono- ou polychromatique) passe à travers une cellule comportant deux compartiments dont l'un est rempli avec la phase mobile seule et l'autre avec l'effluent en sortie de colonne (fig. 2.25). La différence d'indice entre les deux liquides, qui apparaît lorsqu'un composé est mélangé à l'éluant, se traduit par un déplacement angulaire du rayon réfracté. Dans la pratique, le signal correspond à la mesure en continu de la rétroaction qu'il faut fournir à un élément optique pour compenser la déviation du faisceau réfléchi.

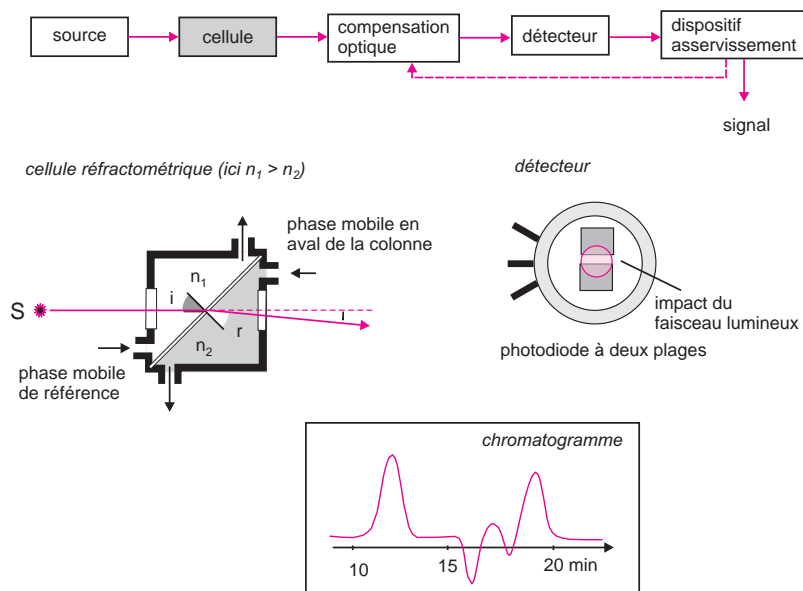


Figure 2.25 Un détecteur réfractométrique différentiel à déviation.

Trajet optique au niveau de la cellule.

Le principe repose sur les lois de Fresnel de transmission de la lumière dans les milieux transparents dont l'indice de réfraction est n . Le contrôle de la position du faisceau réfracté est obtenu avec une photocellule à deux plaques sensibles, dont on maintient les réponses égales par un coin optique (non représenté). Aspect d'un chromatogramme d'un mélange de sucres obtenu avec ce type de détecteur.

Ce détecteur considéré comme quasi universel présente l'inconvénient d'être beaucoup moins sensible que le détecteur UV, et d'être trop sensible aux variations de température. Il faut que sa température soit parfaitement régulée (à $0,001\text{ }^{\circ}\text{C}$) et que la colonne soit thermostatée. Il conduit à des pics négatifs ou positifs, ce qui impose un réglage de la ligne de base à mi-hauteur du graphe. Il ne peut être utilisé qu'en mode isocratique. En effet, en gradient d'éluant, la composition de la phase mobile évolue au cours du temps ainsi que son indice, d'où une dérive de la ligne de base. La compensation, facilement obtenue dans le cas d'un éluant de composition fixe, n'est plus réalisable quand la composition de l'éluant en tête de colonne diffère de celle qui en sort. Il n'est donc utilisé que pour les composés qui n'absorbent pas dans l'UV-Visible ou en série avec d'autres détecteurs.

2.11.4 Autres détecteurs

L'identification d'un composé d'après son seul temps de rétention est quelquefois aléatoire. Elle exige qu'on en dispose à l'état authentique pour pouvoir faire une injection témoin.

Des détecteurs plus perfectionnés, donnant des informations complémentaires sur les produits élués de la colonne, peuvent être installés en sortie de colonne.

On aboutit, quand le détecteur constitue à lui seul une seconde méthode d'analyse, à des identifications bidimensionnelles plus sûres. Dans ce domaine on trouve divers types de spectrophotomètres à qui on fait jouer à la fois le rôle de détecteurs classiques (obtention du chromatogramme) et d'outils d'identification des espèces séparées (*cf.* §16.5). Le couplage avec la spectrométrie de masse (CLHP/SM), est très utile pour identifier les mélanges de composés connus quand on dispose d'une spectrothèque adaptée. Quant au couplage avec la RMN (CLHP/RMN¹H), longtemps considéré comme impossible, il facilite grandement l'étude des mélanges comportant des composés inconnus (*cf.* chapitres 15 et 16).

2.12 TENDANCES ACTUELLES DE LA CLHP

L'intérêt porté à la technique couplée CLHP/SM a fait progresser la chromatographie liquide dans le sens de la miniaturisation (fig. 2.26). En effet le principal problème rencontré lorsqu'on installe un spectromètre de masse en aval d'un chromatographe liquide est l'élimination de la phase mobile. Pour cela le passage à la *chromatographie liquide capillaire* ou à la *nano-chromatographie*, deux techniques en voie de développement, facilite l'interfaçage entre les deux appareils.

L'adaptation de microcolonnes augmente les performances des séparations, mais en contre-partie le passage de la technique au royaume de Lilliput est exigeant sur le plan de la réalisation. Il faut savoir gérer les microdébits de phase mobile, les volumes morts les plus petits possibles sur tout le parcours, de la chambre de mélange pour gradients jusqu'au volume de la cellule de détection (fig. 2.27). On doit utiliser des chromatographes spécifiques encore peu nombreux ou adapter les appareils conventionnels, mais la reproductibilité des gradients est difficile à ce niveau. Les microfuites des pompes deviennent de l'ordre de grandeur des débits à réaliser.

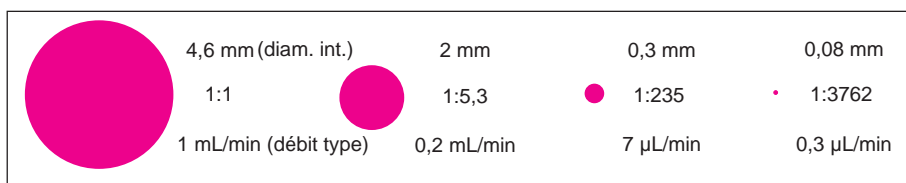


Figure 2.26 Comparaison des débits dans des colonnes de diamètres différents.

En admettant que le remplissage de ces quatre colonnes est de même nature et de même porosité, on voit l'avantage que présente le passage de la CLHP classique (à gauche) à la CLHP-capillaire ou à la nano-CLHP (à droite). Plus le diamètre de la colonne est étroit, plus la consommation de phase mobile diminue.

Outre cette miniaturisation dans l'échelle des quantités séparées, on note encore d'autres axes de progression :

- *Choix de phases stationnaires adaptées* à des séparations particulières : sucres, HPA, amines, nucléotides...
- *Diminution des temps d'analyse* tout en maintenant la résolution. Pour cela on tend à utiliser des colonnes courtes et des phases stationnaires formées soit de particules non poreuses de petit diamètre (3 μm ou moins), soit d'un réseau poreux de gel de silice (colonnes monolithiques), autorisant des débits plus rapides. On peut également opérer à des températures plus élevées. Les équilibres de concentration sont plus rapidement atteints et la viscosité de la phase mobile diminue. La pression étant moins élevée, on peut augmenter le débit et ainsi raccourcir le temps d'analyse. Il est nécessaire cependant de disposer d'installations adaptées.

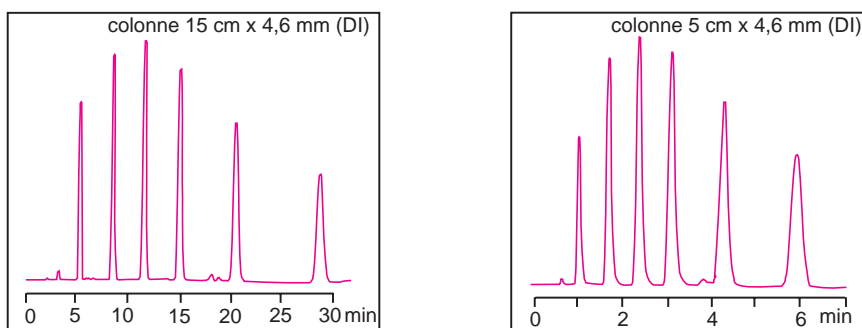


Figure 2.27 Comparaison de deux chromatogrammes obtenus à partir d'un même mélange. Une colonne plus courte et des particules plus petites permettent un gain de temps appréciable pour des performances comparables.

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.hplc.co.uk.com
www.thermo.com/finnigan
www.upchurch.com
www.perkinelmer.com
www.agilent.com

www.varianinc.com
www.dionex.com
www.lcpackings.com
www.shimadzu.com
www.supelco.com

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 2.1

Les appareils actuels de CLHP peuvent utiliser des colonnes de 300 μm de diamètre interne (d_C dans le texte) pour lesquelles le débit optimum conseillé est de 4 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$.

1. Montrer par un calcul simple que ce débit conduit pratiquement à la même vitesse linéaire de la phase mobile que pour une colonne de même type mais d'un diamètre standard de 4,6 mm pour laquelle le débit conseillé est de 1 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

2. La séparation d'un échantillon comportant 16 HPA (hydrocarbures polyaromatiques) a été effectuée sur une colonne de type RP-18 ($L_C = 25 \text{ cm}$, $d_C = 300 \mu\text{m}$). Le débit de la phase mobile (acétonitrile/eau) est de 4 $\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. L'un de ces HPA a un temps de rétention de 48 min.

Calculer le volume de rétention de ce composé. Que peut-on en conclure ?

3. On dispose de deux colonnes remplies de la même phase stationnaire, l'une a un diamètre intérieur d_C de 4,6 mm et l'autre, de 300 μm . Les colonnes ont mêmes longueur et taux de remplissage (V_S/V_M). On décide de les utiliser successivement avec le même chromatographe et dans conditions identiques, avec les débits conseillés ci-dessus pour chacune d'elles. On injecte la même quantité d'un même composé dans les deux expériences.

a) Quand on passe d'une colonne à l'autre, le volume de rétention (ou d'élution) du composé est-il modifié ?

b) Si la sensibilité du détecteur n'a pas été modifiée entre les deux expériences, l'intensité du pic correspondant sera-t-elle différente ?

Exercice 2.2

Quel est l'ordre d'élution des acides suivants en CLHP avec une colonne dont la phase stationnaire est de type C18 et une phase mobile un tampon formiate $C = 200 \text{ mM}$, de pH 9 ?

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1. acide linoléique | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH} = \text{CHCH}_2\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$ |
| 2. acide arachidique | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}_2\text{H}$ |
| 3. acide oléique | $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH} = \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$ |

Exercice 2.3

Indiquer en regard de chacune de ces techniques chromatographiques, le terme qui représente le mode essentiel de fixation sur la phase.

- | | |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| 1. phase inversée | a. masse moléculaire |
| 2. perméation de gel | b. hydrophilie |
| 3. chromatographie ionique | c. hydrophobie |
| 4. phase normale | d. protonation/ionisation |

Exercice 2.4

On étudie par CLHP la séparation de deux composés A et B avec une colonne de type RP-18. La phase mobile est un mélange binaire d'eau et d'acétonitrile. On admettra qu'il existe une relation linéaire entre le logarithme du facteur de capacité et le pourcentage d'acétonitrile du mélange binaire eau/acétonitrile utilisé. À partir de 2 chromatogrammes obtenus l'un avec pour phase mobile un mélange eau/acétonitrile 70/30v/v et l'autre avec un mélange eau/acétonitrile 30/70v/v, les équations des deux droites sont :

pour le composé A : $\log k_A = -6,075 \times 10^{-3} (\% \text{ MeCN}) + 1,3283$

pour le composé B : $\log k_B = -0,0107 (\% \text{ MeCN}) + 1,5235$

- a) Trouver la composition de la phase binaire qui conduirait à un facteur de sélectivité de 1.
- b) On suppose que pour chaque composé, la largeur du pic correspondant sur le chromatogramme à mi-hauteur est la même et que l'efficacité de la colonne n'est pas modifiée suivant la composition de la phase mobile. La résolution entre les deux pics est-elle meilleure pour la phase mobile contenant 70 % d'eau ou 30 % d'eau ? Montrer l'intérêt pratique du choix précédent.

Chapitre 3

Chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique très répandue, dont les premières applications sont maintenant vieilles de plus de 60 ans. Son développement qui n'a cessé depuis, est dû à son extrême sensibilité, à sa polyvalence, à la rapidité de mise au point des analyses nouvelles et aux possibilités d'automatisation, qui augmentent encore plus son intérêt. La séparation sur la colonne se faisant sur des composés qui doivent être à l'état gazeux, l'analyse des liquides ou solides impose de pouvoir les transformer à l'état de vapeur par chauffage. C'est sans doute la principale contrainte à laquelle il faut penser avant de choisir cette technique, puisqu'elle limite son emploi à l'étude des composés moléculaires thermostables et suffisamment volatils. La très grande sensibilité des détecteurs permet de déceler des quantités de l'ordre du picogramme pour certains composés. Les applications sont très nombreuses dans tous les domaines et les développements de la chromatographie gazeuse à grande vitesse ou multidimensionnelle rendent cette technique toujours plus attractive.

3.1 PRINCIPE D'UNE INSTALLATION DE CPG

Un appareil de CPG réunit dans un bâti unique, outre les trois modules classiques, injecteur, colonne et détecteur, un four thermostaté qui permet de porter, si nécessaire, la colonne à une température élevée (fig. 3.1). La phase mobile qui entraîne l'échantillon dans la colonne est un gaz, appelé *gaz vecteur*. Les débits, contrôlés avec précision, permettent une grande répétabilité des temps de rétention.

L'analyse débute à l'instant où on introduit une très petite quantité de l'échantillon, sous forme liquide ou gazeuse, dans l'injecteur, qui a la double fonction de le porter à l'état de vapeur et de l'amener dans le flux gazeux en tête de la colonne. Celle-ci se présente comme un tube de faible section enroulé sur lui-même, de 1 à plus de 100 m de longueur suivant les cas et contenant la phase stationnaire. Cette colonne est placée dans une enceinte à température régulée. Elle peut servir à des milliers d'injections successives. La phase gazeuse qui a traversé la colonne passe dans un détecteur avant de sortir à l'air libre. Certains modèles de chromatographes ont une alimentation autonome ainsi qu'une taille réduite pour faciliter l'emploi en milieu extérieur, sur le terrain (fig. 3.16).

■ En CPG il y a quatre paramètres opérationnels pour une phase stationnaire donnée : L , longueur de la colonne et u , vitesse de la phase mobile (qui conditionnent N), T température de la colonne et β rapport de phase (qui conditionnent k). Les réglages du chromatographe permettent d'agir sur T et sur u , donc sur l'efficacité et sur les facteurs de rétention.

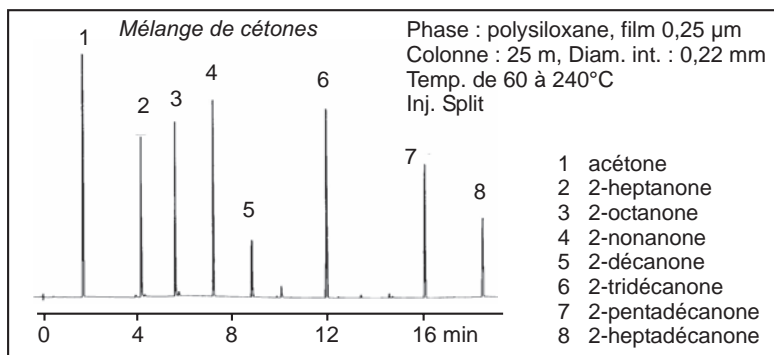
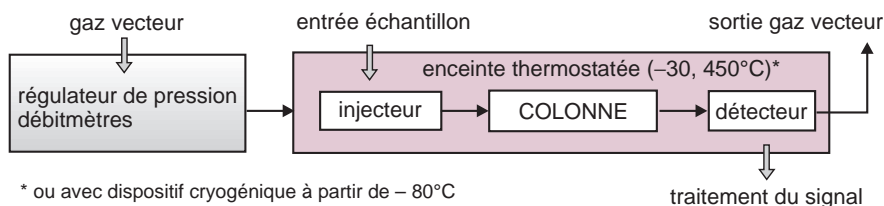


Figure 3.1 Une installation de CPG.

Un chromatographe commercial, le modèle 6890 de la société Agilent Technologies. L'instrument représenté comporte également un porte-échantillons et un injecteur automatique. Schéma fonctionnel d'un appareil de CPG. Chromatogramme d'un mélange de cétones.

3.2 GAZ VECTEUR ET RÉGULATEUR DE DÉBIT

On utilise comme phase mobile l'un des trois gaz suivants : l'hélium, le diazote ou le dihydrogène. Ils proviennent soit d'un cylindre sous pression soit d'un générateur (électrolyse de l'eau pour H_2 et séparation de l'air pour N_2), ce qui a l'avantage de fournir sur place un gaz très pur. Ce gaz vecteur doit être exempt de traces d'hydrocarbures, de vapeur d'eau et de dioxygène qui se comportent comme des impuretés préjudiciables pour certaines phases stationnaires polaires et qui réduisent la sensibilité des détecteurs. C'est la raison pour laquelle on place un double filtre, desséchant et réducteur, juste en amont du chromatographe.

La nature du gaz vecteur ne modifie pas de manière significative les valeurs des coefficients de distribution K des composés par suite de l'absence d'interaction entre gaz et solutés, la température étant le seul facteur de modification important. En revanche, la viscosité et la vitesse du gaz dans la colonne ont une influence sur la dispersion des composés dans la phase stationnaire et sur la diffusion dans la phase mobile (cf. équation de Van Deemter), donc sur le paramètre d'efficacité N et sur la sensibilité de la détection (fig. 3.2).

La pression en tête de colonne (quelques dizaines à quelques centaines de kPa) est soit stabilisée avec un système mécanique, soit asservie électroniquement afin que le débit demeure constant (système *EPC*, pour *electronic pressure control*). En effet, pour une analyse réalisée en mode de programmation ascendante de température, la viscosité de la phase stationnaire et par suite la perte de charge augmentent au cours du temps. Il est donc préférable que la pression soit corrigée pour conserver au gaz vecteur une vitesse constante et optimale. Il en résulte une analyse plus rapide et une longévité accrue des colonnes.

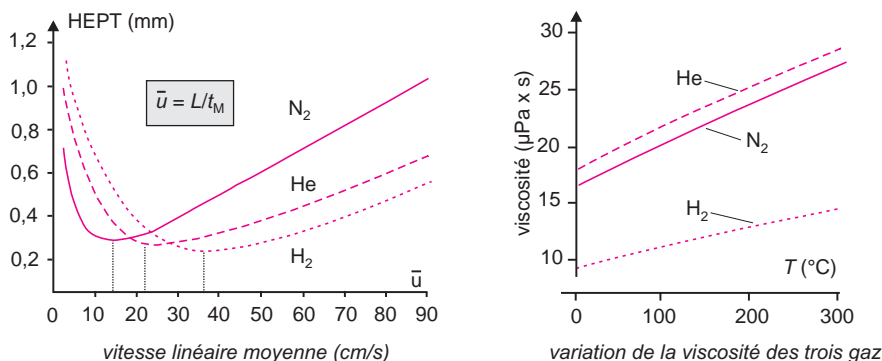


Figure 3.2 Efficacité en fonction de la nature et de la vitesse linéaire du gaz vecteur.

Ces courbes typiques de van Deemter montrent que l'hydrogène est, parmi les 3 gaz étudiés, celui qui permet les séparations les plus rapides, à performances égales, tout en donnant plus de souplesse en ce qui concerne le débit, ce qui est très utile en mode programmation de température. Noter l'augmentation de la viscosité de ces gaz avec la température T . On constate aussi que l'hélium est plus visqueux que le diazote, à température égale.

■ L'injecteur et le détecteur ont des volumes morts qui entrent en ligne de compte dans le volume de rétention total. En CPG la phase mobile étant compressible, le débit mesuré en sortie de colonne doit être corrigé par le facteur de correction de compression J , qui tient compte de la surpression en amont de la colonne (cf. formule 3.1). Si le chromatogramme comporte un pic dû à un composé non retenu, il est possible de calculer la vitesse moyenne

de progression du gaz vecteur dans la colonne. Par ailleurs, en adaptant un débitmètre à bulle de savon en sortie de colonne, on peut, connaissant son diamètre, en déduire la vitesse \bar{u}_0 du gaz vecteur à la sortie de l'appareil, à la pression atmosphérique P_0 . Le rapport entre ces deux vitesses est égal à J , facteur de compression (ou coefficient de perte de charge), lui-même relié à la pression relative P/P_0 (P pression en tête de colonne) :

$$J = \frac{\bar{u}}{u_0} = \frac{3}{2} \cdot \frac{(P/P_0)^2 - 1}{(P/P_0)^3 - 1} \quad (3.1)$$

3.3 INTRODUCTION DE L'ÉCHANTILLON ET CHAMBRE D'INJECTION

3.3.1 Introduction de l'échantillon

Une très petite quantité d'échantillon en solution (ex. 0,5 μL), est introduite dans l'appareil avec une microseringue (fig. 3.3) dont il existe de nombreux modèles adaptés aux divers injecteurs et colonnes. Pour les échantillons gazeux on utilise des vannes à boucles semblables à celles que l'on rencontre en chromatographie liquide (cf. § 2.4). Pour mieux maîtriser la reproductibilité des injections – le simple changement d'opérateur pouvant conduire, en mode manuel, à des différences –, on adapte presque toujours un *injecteur automatique* grâce auquel les mouvements de la seringue sont automatisés (fig. 3.1). Associé à un carrousel porte-échantillons, il devient possible de programmer la séquence cyclique de prélèvement de l'échantillon, de son introduction très rapide dans l'injecteur (0,2 s) et du rinçage de la seringue. Cette dernière phase est importante pour éviter les contaminations d'un échantillon à l'autre lorsqu'il s'agit de dosages enchaînés de manière automatique.

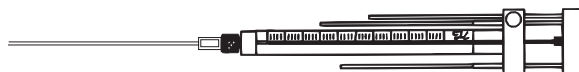


Figure 3.3 Seringue de 10 μL d'un type courant, utilisé en CPG.

Un guide évite de tordre le piston, très fragile. Dans d'autres modèles (0,5 à 1 μL), le piston rentre dans l'aiguille pour libérer la totalité de l'échantillon et éviter tout volume mort (reproduit avec l'autorisation de la société Hamilton).

- Une technique d'échantillonnage connue sous le nom d'« espace de tête », dont il existe deux variantes, dites statique et dynamique, est très répandue en CPG pour faire l'analyse qualitative des constituants volatils des échantillons (cf. chapitre 21).

3.3.2 Injecteurs

L'injecteur est la porte d'entrée de l'échantillon dans le chromatographe. Il a deux autres fonctions : *vaporiser* et *entraîner* en tête de colonne l'échantillon mélangé au gaz vecteur. Les caractéristiques des injecteurs, ainsi que les modes d'injection, diffèrent suivant les types de colonnes auxquels ils sont réunis. La qualité des séparations dépend de cette phase de l'analyse.

Injecteur à vaporisation directe. Il consiste en un tube métallique doublé d'un chemisage de verre (appelé *insert*), balayé par le gaz vecteur et chauffé à la température moyenne d'ébullition des composés à chromatographier. L'aiguille de la microsiringue contenant l'échantillon traverse l'une des extrémités de l'injecteur obturée par une pastille d'élastomère siliconé (le *septum*). L'autre extrémité est raccordée à la colonne également chauffée (fig. 3.4). La totalité de l'échantillon introduit, immédiatement vaporisé, part dans la colonne en quelques secondes. Cette méthode convient pour les colonnes remplies et les grosses colonnes capillaires, quand le débit de gaz vecteur atteint au moins 8 mL/min.

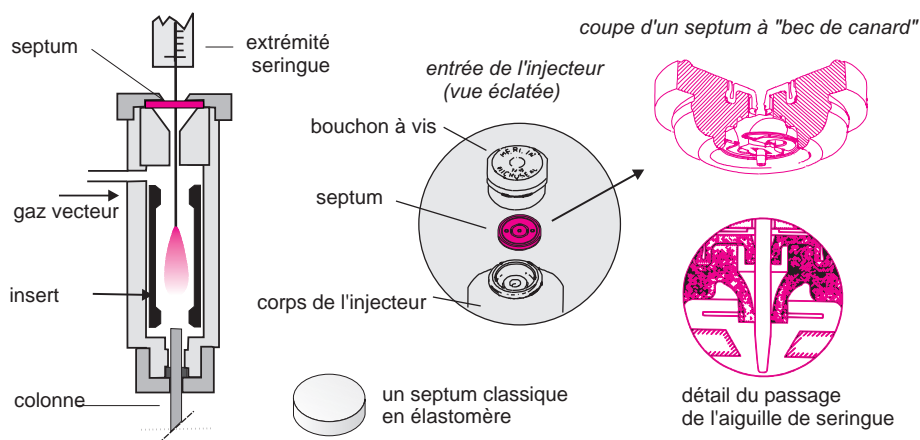


Figure 3.4 Injecteur à vaporisation directe utilisé pour colonnes remplies.

Schéma de base d'un modèle classique à septum. Il existe une grande variété d'inserts en fonction des applications. A droite une variante de septum (le « microseal » Merlin), pouvant servir des milliers de fois (reproduit avec l'autorisation de la société Agilent Technologies).

Injecteur avec ou sans division. Pour les *colonnes capillaires*, à faible capacité d'échantillon, les plus petits volumes qu'il est possible de prélever avec une microsiringue (0,1 µL) peuvent saturer la colonne. On utilise alors des injecteurs pouvant fonctionner suivant deux modes, *avec* ou *sans division* (encore appelés *split* ou *splitless*).

Un courant de gaz vecteur arrive avec un grand débit dans la chambre de vaporisation où il se mélange à l'échantillon injecté (fig. 3.5). Une vanne de fuite, couramment réglée entre 50 et 100 mL/min, divise ce débit en deux fractions dont la plus importante est éliminée du corps de l'injecteur en entraînant la majeure partie de l'échantillon introduit. Le rapport de division (*split ratio*) peut varier entre 20 et 500. Seule la plus petite fraction pénètre dans la colonne. Elle contient une fraction de l'échantillon qui est égale au rapport de division.

$$\text{Rapport de division} = (\text{débit sortie split} + \text{débit sortie colonne}) / (\text{débit sortie colonne})$$

Ce type d'injecteur peut également fonctionner en mode *splitless*. Dans ce mode d'introduction réservé aux échantillons en solution très diluée, on injecte lentement le contenu de la microsiringue en laissant la vanne 2 (fig. 3.5) en position fermée durant 0,5 à 1 minute afin que les composés vaporisés avec le solvant se concentrent dans les tous premiers décimètres de la colonne. Ce mode d'injection, qui demande plus d'expérience, se fait à une température plus basse au départ afin que le solvant précède les composés dans la colonne.

L'ouverture de la vanne 2 élimine de l'injecteur l'excès d'échantillon. La discrimination entre les composés est très faible.

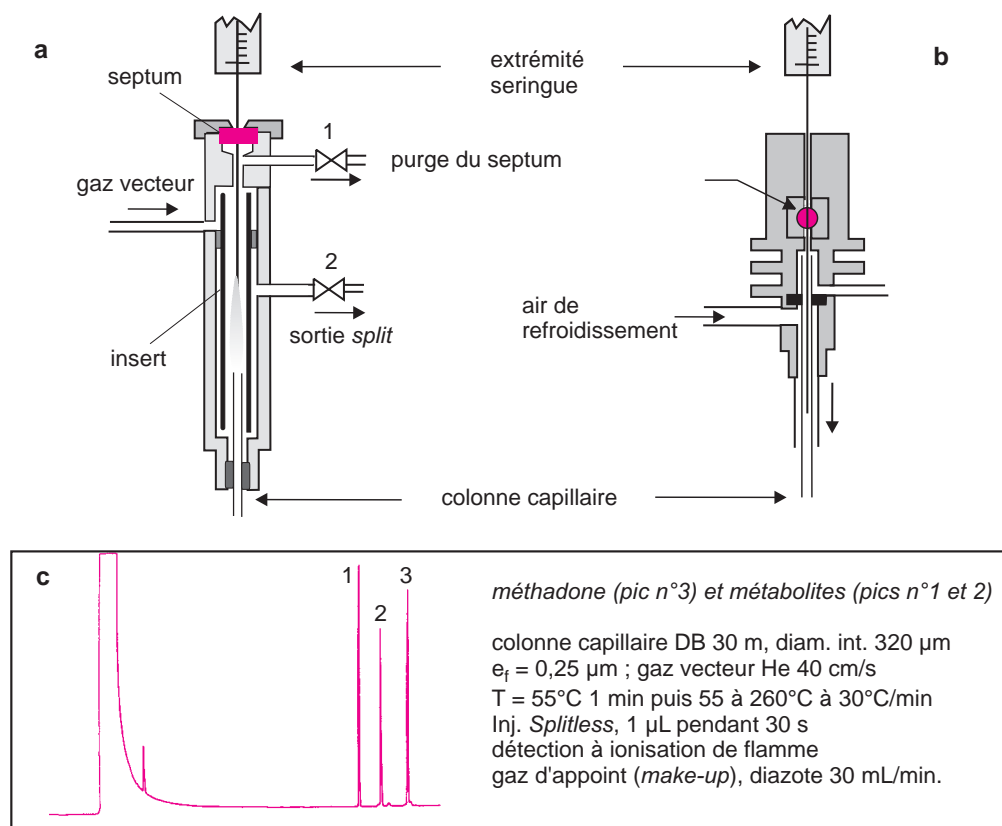


Figure 3.5 Injecteurs.

En haut : à gauche, chambre d'injection avec diviseur (la sortie 2 règle le *split*) ; à droite, injection à froid dans la colonne ; en bas : aspect typique d'un chromatogramme obtenu en mode *splitless*. Le pic solvant peut occulter une partie des composés, à moins d'utiliser un détecteur sélectif qui ne « voit » pas le solvant.

■ En analyse quantitative, l'injecteur avec diviseur peut conduire à des erreurs de concentrations dues à une forte discrimination entre les composés dont les volatilités sont très différentes : la composition de la fraction rentrant dans la colonne est différente de celle de la fraction éliminée. On évite donc ce mode d'injection lorsqu'on utilise la méthode de l'étalon externe (cf. section 1.15). Ce problème peut être en partie corrigé par la forme et le volume du manchon en verre qui se trouve dans l'injecteur.

Injecteur à température programmable. Cet injecteur encore appelé PTV, (*Programmed Temperature Vaporizer*), est de conception analogue à celle de l'injecteur split/splitless. Cependant la température de la chambre d'injection peut être programmée, de 20 à plus de 300 °C, en quelques dizaines de secondes (fig. 3.6).

Il conjugue les avantages de l'injection en mode split ou splitless à ceux de l'injection, à froid dans la colonne. On peut citer plus particulièrement :

- l'absence de discrimination due à l'aiguille ;
- l'utilisation de seringues classiques ;
- l'élimination du solvant ou des composés de bas point d'ébullition ;
- un plus grand volume d'injection.

Ses trois principaux modes de fonctionnement sont l'injection à froid en mode split, l'injection à froid en mode splitless et l'injection avec élimination du solvant.

Dans l'*injection avec division, à froid*, l'échantillon est introduit dans la chambre de vaporisation froide. Immédiatement après, la vanne de fuite est ouverte et l'injecteur est chauffé. Comme l'échantillon n'est pas instantanément vaporisé, le solvant et les différents composés pénètrent dans la colonne dans l'ordre de leur point d'ébullition. De ce fait, il n'y a, à aucun moment, surcharge de la colonne.

L'*injection sans division, à froid*, est utilisée pour l'analyse de traces, la vanne de fuite est fermée pendant l'injection. La chambre d'injection est ensuite chauffée afin de transférer l'échantillon dans la colonne maintenue froide.

Dans le mode *injection avec élimination de solvant*, l'échantillon est introduit dans l'injecteur froid. Après injection, la vanne de fuite est ouverte, le débit de fuite est très élevé et peut atteindre 1 000 mL/min pour éliminer tout le solvant. Puis l'injecteur est ensuite chauffé pour permettre le transfert des composés lourds dans la colonne, la vanne de fuite étant fermée (mode splitless). Il est ainsi possible d'injecter jusqu'à 50 μL en une seule injection ou jusqu'à 500 μL d'échantillon en solution dans un solvant volatil, en plusieurs injections. Cette technique permet donc d'éliminer l'étape de concentration préliminaire avant injection.

Injection à froid dans la colonne.

Ce procédé (COC, *Cold On Column*) consiste à injecter l'échantillon directement à l'intérieur de la colonne capillaire (« *on column* »), sa vaporisation

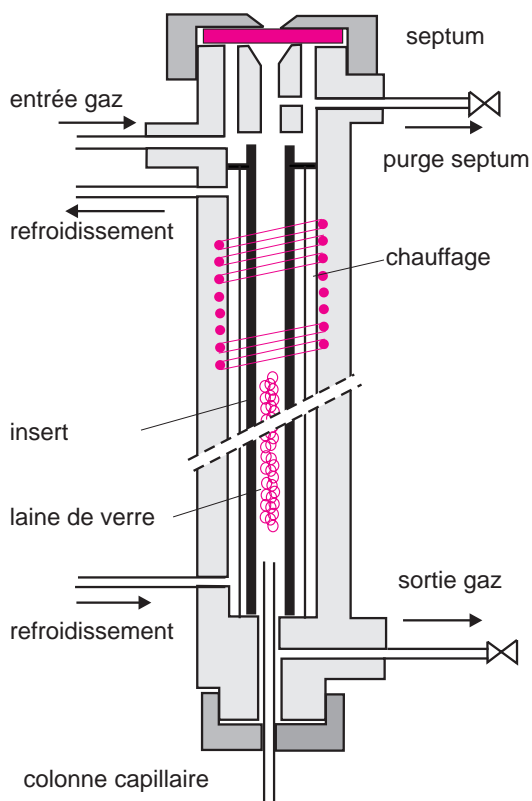


Figure 3.6 Injecteur PTV, à température programmable. Pour permettre de faire des gradients rapides de température, la chambre d'injection est entourée d'une résistance et d'une circulation de gaz froid.

se faisant après dépôt. L'utilisation d'une microseringue dont l'aiguille (acier ou silice), a un diamètre de l'ordre de 0,15 mm seulement est nécessaire pour pénétrer dans la colonne. Celle-ci est refroidie vers 40 °C avant de reprendre sa température normale. Ce procédé utile pour les composés fragiles est difficile à maîtriser sans injecteur automatique. Il est réputé pour ne pas provoquer de discrimination entre les composés dont les volatilités sont différentes (fig. 3.5).

3.4 ENCEINTE THERMOSTATÉE

Le chromatographe comporte une enceinte qui permet de chauffer la colonne jusqu'à plus de 400 °C. Elle doit avoir une faible inertie thermique pour permettre une montée contrôlée et rapide en température (rampe pouvant aller jusqu'à 100 °C/min) et une excellente stabilisation (au 1/10 de °C). En adjoignant une vanne cryogénique alimentée par N₂ ou CO₂ liquides, l'enceinte peut être réglée à basse température.

3.5 COLONNES

Il existe deux types de colonnes, les colonnes *remplies* (ou colonnes à *garnissage*) et les colonnes *capillaires* (fig. 3.7). Elles n'offrent pas les mêmes performances. Pour les colonnes remplies, la phase stationnaire est immobilisée par imprégnation ou par réaction chimique avec le support poreux. Pour les colonnes capillaires, une faible épaisseur de phase stationnaire est soit déposée, soit greffée sur la surface interne de la colonne.

3.5.1 Colonnes remplies (à garnissage)

Ces colonnes, d'un diamètre de 1/8 ou 1/4 d'inch (3,18 ou 6,35 mm) et de 1 à 3 m de long, sont fabriquées à partir d'un tube d'acier ou de verre dont la paroi interne est traitée pour éviter d'éventuels effets catalytiques sur l'échantillon. Elles supportent un débit de gaz vecteur allant de 10 à 40 mL/min. Elles contiennent un support poreux et inerte. Il s'agit de solides ayant une surface spécifique de 2 à 8 m²/g qui se présentent sous forme de grains sphériques d'environ 0,2 mm de diamètre. Ils sont obtenus à partir de diatomites, silicates fossiles (kieselguhr, tripoli) dont le squelette est chimiquement comparable à de la silice amorphe, et d'un liant. L'un des plus connus porte le nom de Chromosorb®. D'autres matériaux de synthèse ont également été développés, tel le Spherosil® constitué de petites sphères de silice. La présence de nombreux groupements silanols confère à tous ces supports une réactivité chimique comparable à celle du gel de silice. Tous ces supports permettent le greffage ou l'imprégnation de la phase stationnaire (à un taux qui peut varier entre 3 et 25 %).

Bien qu'ayant des performances moins élevées que les colonnes capillaires, elles sont toujours utilisées pour certaines analyses de routine normalisées. Elles sont faciles à fabriquer à façon à partir d'un grand choix de phases stationnaires. Elles ne sont cependant pas adaptées aux analyses de traces actuelles.

3.5.2 Colonnes capillaires (à tube ouvert)

Elles sont généralement en *silice fondue* de grande pureté, obtenue par combustion de tétrachlorosilane (SiCl_4) dans une atmosphère de dioxygène. Le diamètre interne de ces colonnes varie de 100 à 530 μm (la précision est de quelques %). La technologie est particulièrement délicate pour obtenir des colonnes parfaitement cylindriques, dont la longueur peut aller jusqu'à 100 m pour une paroi d'environ 50 μm (fig. 3.7). Elles comportent un revêtement extérieur brun de polyimide, polymère thermiquement stable ($T_{\text{max}} = 370\text{ }^\circ\text{C}$), pour les rendre moins fragiles et pouvoir les enrouler sur elles-mêmes grâce à un support métallique adapté. Quelques fabricants proposent aussi des colonnes faites à partir d'un capillaire en métal (aluminium, nickel ou acier) qui acceptent, si la phase stationnaire le permet, des températures atteignant 450 $^\circ\text{C}$. La paroi interne de la colonne subit divers traitements pour la préparer à une bonne fixation de la phase stationnaire. Il peut s'agir d'une attaque chimique (HCl à 350 $^\circ\text{C}$), ou d'un dépôt d'une fine épaisseur d'alumine ou de gel de silice.

La phase stationnaire recouvre la paroi interne sur une épaisseur régulière pouvant aller de 0,05 à 5 μm . Elle est ou simplement *déposée* ou mieux *greffée* par des liaisons covalentes éventuellement suivie d'une polymérisation avec réticulation sur la paroi. Ce dépôt est obtenu par évaporation d'une solution ou par polymérisation *in situ* au contact de la paroi. Ce sont les colonnes WCOT (*Wall Coated Open Tubular*), et PLOT (*Porous Layer Open Tubular*) suivant la nature de la phase stationnaire concernée. Certaines résistent à des rinçages périodiques avec des solvants pour leur faire retrouver leurs performances initiales.

■ **Colonnes « 530 μm ».** Constituées par un capillaire de 0,53 mm de diamètre interne et de 5 à 50 m de long, ces colonnes désignées par « widebore », « megabore » ou « macrobore » nécessitent un débit de gaz vecteur d'au moins 5 mL/min. Les performances de ces colonnes sont inférieures à celles des colonnes capillaires de plus petit diamètre, mais elles peuvent être substituées aux colonnes remplies sur les chromatographes plus anciens, tout en conservant les mêmes injecteurs et détecteurs. Elles sont supérieures à ces dernières car elles ont aussi pour intérêt de donner très peu de ressuage, (bleed selon le terme anglais), c'est-à-dire de perte progressive de phase stationnaire. Ces colonnes sont de type WCOT ou PLOT, rarement des colonnes remplies.

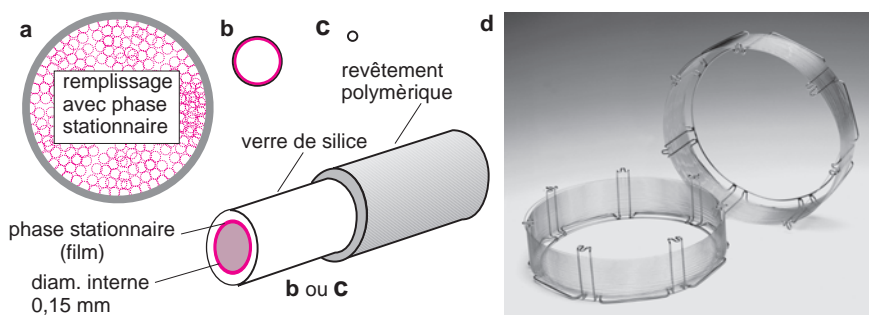


Figure 3.7 Colonnes de CPG.

Représentation à la même échelle des sections des trois types de colonnes. a) Colonne remplie de 2 mm de diamètre ; b) colonne capillaire « 530 » de 0,53 mm ; c) colonne capillaire de 0,1 mm ; détail d'une colonne capillaire. À cette échelle, l'épaisseur de phase stationnaire serait à peine visible ; d) colonnes commerciales de 50 m de longueur (Document de la Société Alltech).

■ Pour déposer une couche d'épaisseur connue, la colonne est remplie avec une solution de concentration calculée de phase stationnaire (par exemple à 0,2 % dans l'éther) pour qu'après évaporation, on obtienne l'épaisseur désirée. La couche peut être ensuite réticulée par un peroxyde ou par irradiation γ . Un tel procédé est comparable au dépôt d'une peinture sur une surface après avoir fixé une couche d'apprêt pour favoriser un bon accrochage.

3.6 PHASES STATIONNAIRES

Pour les colonnes remplies, la technique d'imprégnation, de mise en œuvre très simple, permet de choisir de nombreux composés organiques peu volatils à usage de phases stationnaires. Mais, pour les colonnes capillaires, les contraintes de fabrication imposent un choix beaucoup plus limité. Les phases actuelles correspondent à deux principaux types de composés : les *polysiloxanes* et les *polyéthylèneglycols*, chaque catégorie pouvant faire l'objet de modifications structurales mineures. On peut y ajouter les phases particulières à base de *cyclodextrines* pour l'étude des composés optiquement actifs.

Toutes ces phases sont utilisables entre deux températures, l'une minimale au-dessous de laquelle les équilibres de concentration sont trop lents à se faire, l'autre qui définit la limite supérieure d'utilisation sans dégradation, qui dépend de la nature et de l'épaisseur du film.

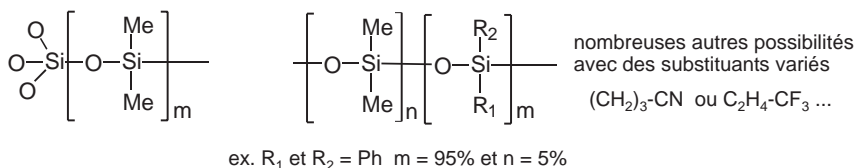
■ Les phases stationnaires décrites ci-dessous sont les plus classiques, mais dans les catalogues sont aussi présentes des phases optimisées pour des applications particulières : séparations de produits sulfurés, des pesticides chlorés, des gaz permanents, d'aldéhydes, des triglycérides, des HPA ou de produits pétroliers...

3.6.1 Polysiloxanes

Les polysiloxanes (également connus sous le nom d'huiles et gommages silicones) correspondent à la répétition d'un motif de base comportant deux chaînes carbonées par atome de silicium (fig. 3.8). Les grandes firmes mondiales en commercialisent une vingtaine de diverses compositions avec des chaînes alkyle ou aryle (méthyle ou phényle) pouvant comporter en plus des fonctions (ex. cyanopropyle, trifluoropropyle). Les monomères, combinés en diverses proportions, permettent de moduler les propriétés des phases stationnaires (polarité et domaine de stabilité souvent de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ à $300/325\text{ }^{\circ}\text{C}$, pour les diméthylpolysiloxanes, selon le type de colonne). Grâce à leur gamme de température très étendue, ce sont, pour les colonnes capillaires, les phases les plus utilisées.

■ La phase très connue qui sert de référence, parce qu'elle est la seule à être parfaitement définie, est le **squalane** dont la polarité est nulle dans l'échelle établie par McReynolds (cf. 3.10.3). Cet hydrocarbure saturé ($\text{C}_{30}\text{H}_{62}$) dérive du squalène, terpène naturel extrait du foie de requin. Il est également présent dans le sébum de la peau. Sur cette phase utilisable entre 20 et $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ (en mode déposé ou en imprégnation), les composés sont élués dans l'ordre de leur température d'ébullition croissante (le temps de rétention étant inversement proportionnel à la pression de vapeur). Diverses phases greffées à base de polyalkylsiloxanes, pratiquement apolaires, remplacent le squalane.

polysiloxanes greffés (exemples)



un exemple de formation d'une phase greffée

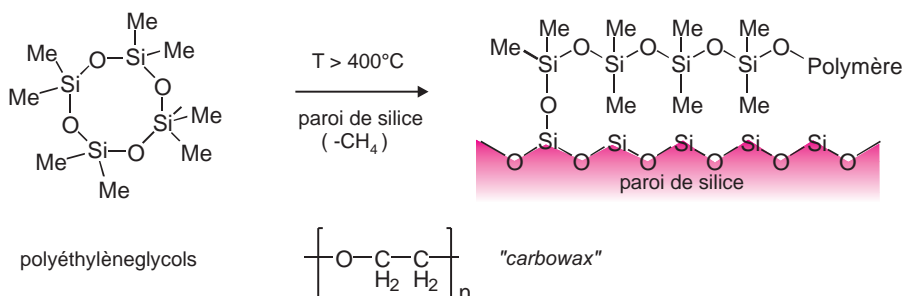


Figure 3.8 Structure des polysiloxanes (silicones), et des polyéthylèneglycols.

L'inventaire de toutes les compositions de phases de ce type, utilisées en imprégnation ou en greffage, serait long. Traitement de la paroi interne d'une colonne en silice par le tétradiméthylsiloxane pour obtenir une phase stationnaire greffée, polymérisée et ensuite réticulée. (Le greffage ressemble à la fixation indélébile des colorants pour obtenir des tissus grand teint : le colorant est porteur d'un site réactif afin qu'il puisse s'accrocher par exemple aux fonctions alcool de la cellulose des fibres de coton).

3.6.2 Polyéthylèneglycols (PEG)

Les représentants les plus connus de cette famille sont les **Carbowax**[®] (fig. 3.8), polymères polaires ($M = 1\,500$ à $20\,000$ – pour le Carbowax 20M) qui peuvent être utilisés en mode déposé, imprégné ou greffé ($40 < T < 240/260$ °C, selon le type de colonne).

3.6.3 Phases stationnaires chirales

Ce sont généralement des phases polysiloxanes contenant entre 10 et 20 % en masse de molécules de β -cyclodextrine (polysaccharide) incluses dans le polymère de base (fig. 3.9). On utilise ce type de colonne lorsqu'on s'intéresse à la pureté optique des analytes. Si un composé organique, par exemple, comporte un carbone asymétrique, les énantiomères R et S n'auront pas tout à fait la même affinité pour la phase stationnaire chargée en cyclodextrine ce qui se traduira par des temps de rétention différents. Donc un composé chimiquement pur à l'état de racémate donnera naissance à deux pics égaux, chacun correspondant à un seul énantiomère (*cf.* § 2.7).

■ Certaines colonnes peuvent supporter des températures allant jusqu'à plus de 450 °C (ex. DEXSIL 400 ou PETROCOL). Parmi les applications classiques, figurent l'analyse directe des triglycérides des corps gras et la distillation simulée dans l'industrie pétrolière, cette dernière pour remplacer la distillation conventionnelle dont l'exécution peut prendre une centaine d'heures par analyse (fig. 3.10).

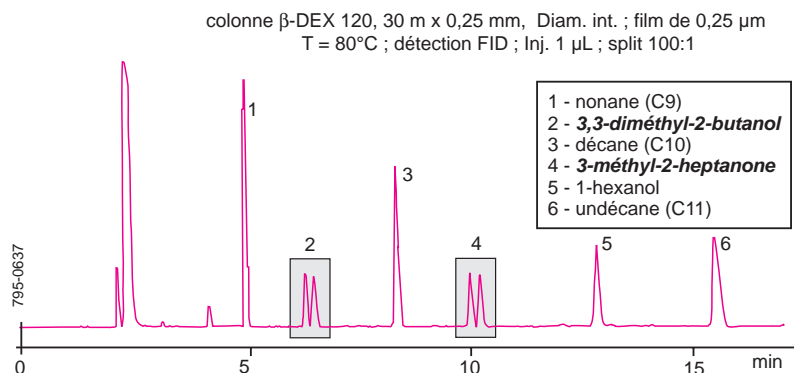


Figure 3.9 Exemple de séparation obtenue avec une phase chirale comportant des cyclodextrines.

En utilisant une colonne chirale les composés à l'état de racémate se dedoublent, ce qui est le cas pour les deux alcools 2 et 4. Noter que cette chromatographie en régime isotherme permettrait également de calculer les indices de rétention des composés séparés (adapté d'une illustration de la société Supelco).

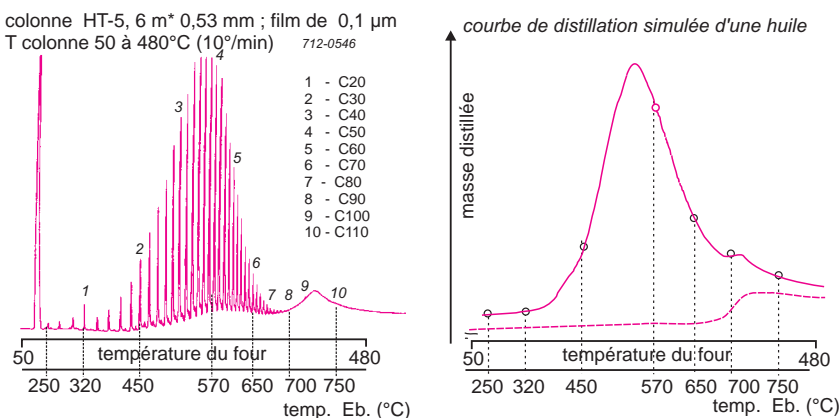


Figure 3.10 Distillation simulée d'une huile de lubrification (type polywax).

En utilisant une colonne résistante à des températures élevées, on commence par faire correspondre les *temps de rétention* et les *températures d'ébullition* d'une série d'oligomères connus. On chromatographie ensuite l'échantillon « à distiller » dans les mêmes conditions de programmation. Un logiciel conduit alors, d'après ce chromatogramme, à une courbe de distribution identique à celle qu'on obtiendrait par distillation, ce qui demanderait beaucoup plus de temps (documents SGE 712-0546 et -0547).

3.6.4 Phases stationnaires solides

Ces phases sont constituées par des matériaux adsorbants divers : silice ou alumine désactivées par des sels minéraux, tamis moléculaires 5 Å, verres ou polymères poreux, carbone graphité (ex. Chromosorb® 100, Porapak®). Dans le cas des colonnes capillaires à couche poreuse (PLOT), ces matériaux sont déposés en une couche uniforme, sous forme de particules très fines, sur la paroi interne de la colonne. On les utilise pour séparer les composés gazeux ou très volatils. Les colonnes à phase graphite, en particulier, ont été développées pour la séparation de N₂, CO, CO₂ et des hydrocarbures très légers. Leur efficacité est grande (cf. fig. 3.11).

■ Historiquement le gel de silice, matériau thermiquement stable et insensible à l'oxygène, a été l'un des premiers composés ayant servi de phase stationnaire, pour la réalisation de colonnes de CPG (fig. 3.11). Aujourd'hui les phases solides sont devenues des matériaux très élaborés.

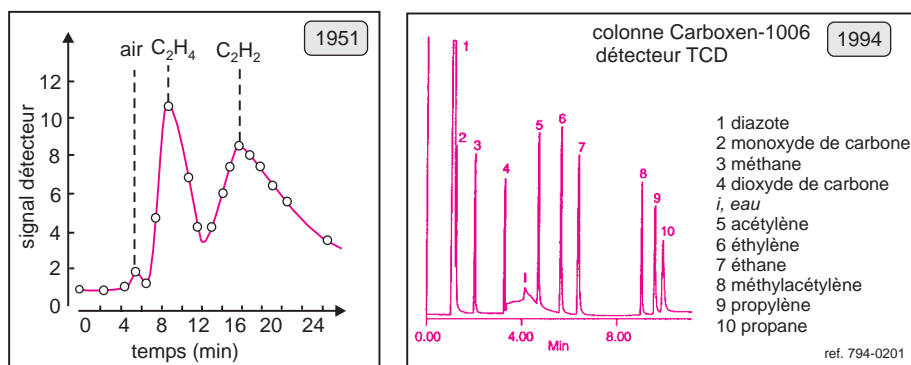
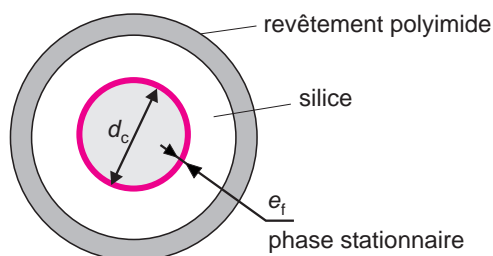


Figure 3.11 Analyses de gaz.

À gauche, l'un des tous premiers chromatogrammes, obtenu point par point, représentant un mélange d'air, d'éthylène et d'acétylène séparés sur gel de silice (E.Cremer et F.Prior, *Z. Elektrochem.* 1951, 55, 66). À droite, une analyse de gaz sur colonne PLOT moderne (reproduit avec l'autorisation de la société Supelco).

■ Pour comparer ou prévoir le comportement des colonnes capillaires, il est utile de calculer le rapport de phase $\beta = V_M/V_S$. En appelant d_c le diamètre interne de la colonne et e_f l'épaisseur du film déposé, un calcul approximatif conduit à :



$$\beta = \frac{V_M}{V_S} = \frac{d_c}{4e_f} \quad (3.2)$$

Si les composés à séparer sont volatils, on choisira une colonne dont le rapport β sera petit (< 100), et inversement. Une colonne de $320 \mu m$ dont la phase stationnaire fait $1 \mu m$ d'épaisseur, conduit à $\beta = 80$ alors que pour une colonne de $250 \mu m$ et une épaisseur de phase de $0,2 \mu m$, $\beta = 310$. En remarquant que $K = k\beta$, il résulte que k , pour un composé et une phase stationnaire donnés, augmente si β diminue. β , accessible à partir des caractéristiques physiques de la colonne permet de calculer les coefficients de partage K dont les valeurs sont généralement très grandes (1 000 par exemple), ce qui est dû à la nature de la phase mobile qui est ici un gaz.

3.7 PRINCIPAUX DÉTECTEURS

Certains détecteurs sont universels, c'est-à-dire qu'ils sont sensibles à pratiquement tous les composés élués, d'autres sont beaucoup plus sensibles à un type particulier de molécules.

Un détecteur spécifique, qui ne voit que certains produits, donnera un chromatogramme plus simple. À la limite, pour doser un analyte, l'idéal serait de disposer d'un détecteur ne voyant que lui. On peut répartir les détecteurs en deux groupes, ceux qui conduisent aux seuls temps de rétention, et ceux qui donnent, en outre, des informations structurales sur les composés détectés. Tous les détecteurs donnent une réponse qui dépend de la concentration molaire ou massique du soluté dans le gaz vecteur. Plusieurs détecteurs peuvent être associés en série (fig. 3.15).

3.7.1 Détecteur à conductibilité thermique (TCD)

Ce détecteur universel, mis au point dès les débuts de la CPG, est longtemps resté incontournable. Sa miniaturisation permet de l'utiliser aussi bien pour les colonnes remplies que pour les colonnes capillaires. De sensibilité moyenne, si on le compare aux autres détecteurs, il a néanmoins une gamme dynamique très étendue (6 décades). Son principe repose sur la mesure des variations de conductibilité thermique des mélanges gazeux en fonction de leur composition. Il s'agit d'un *catharomètre* comportant deux thermistors identiques, placés dans deux minuscules cavités d'un bloc métallique thermostaté à une température supérieure à celle de la colonne (fig. 3.12). L'un d'eux est baigné par le gaz vecteur prélevé en amont de l'injecteur et l'autre par le gaz vecteur en aval de la colonne.

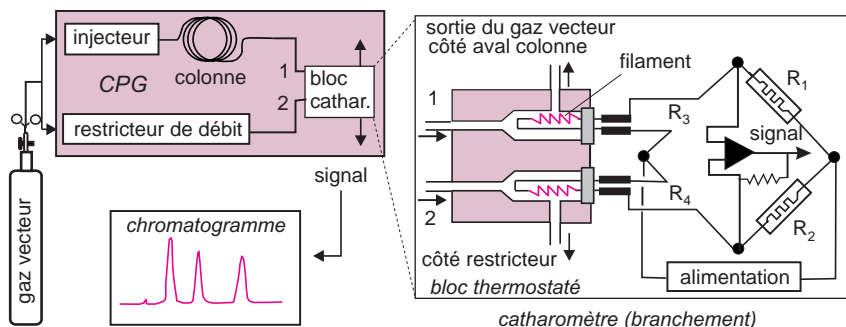


Figure 3.12 Détecteur à conductibilité thermique.

À gauche agencement montrant la circulation du gaz vecteur. À droite schéma d'un bloc catharométrique classique avec le principe de son raccordement électrique dans un montage du type pont de Wheatstone (équilibré si $R_1/R_2 = R_3/R_4$). En régime stationnaire il s'établit un équilibre de température, donc de résistance, fonction de la conductibilité thermique du gaz vecteur et de l'intensité électrique. Lorsqu'un soluté est élué, le changement de composition de la phase gazeuse modifie sa conductibilité. L'équilibre thermique est rompu, d'où il résulte une variation de la résistance du filament, proportionnelle à la concentration du composé dans le gaz vecteur (en général la résistance diminue si la température augmente).

3.7.2 Détecteur à ionisation de flamme (FID)

Considéré comme pratiquement universel pour les composés organiques, c'est le détecteur par excellence de la CPG actuelle. Le courant gazeux issu de la colonne pénètre dans la flamme d'un petit brûleur alimentée par un mélange d'hydrogène et d'air. Ce détecteur détruit l'échantillon dont la combustion produit des ions et particules chargées, responsables

du passage d'un courant ionique extrêmement faible (10^{-12} A) entre deux électrodes (*ddp* de 100 à 300 V). L'extrémité du brûleur sert d'électrode de polarisation (masse). La seconde électrode, de forme annulaire, entoure la flamme. Le signal est amplifié par un électromètre en une tension mesurable (fig. 3.13). Pour les composés organiques, l'intensité du signal est sensible au *débit massique* de l'échantillon, sachant bien que la présence de certains hétéroéléments tels les halogènes, peut modifier notablement la réponse. L'aire du pic reflète donc la masse du composé élué (dm/dt intégré entre les instants de début et de fin de pic dont la masse totale est m). Le FID est donc à l'abri des variations de débit qui peuvent conduire à des erreurs avec les détecteurs du type TCD. Pour les composés organiques, la sensibilité, très grande, s'exprime en C/g de l'élément carbone. La limite de détection est de 2 ou 3 pg/s. et la linéarité atteint 10^8 (8 décades). Cependant la linéarité ne doit pas faire oublier que c'est avec les solutions les plus diluées que la résolution est la meilleure.

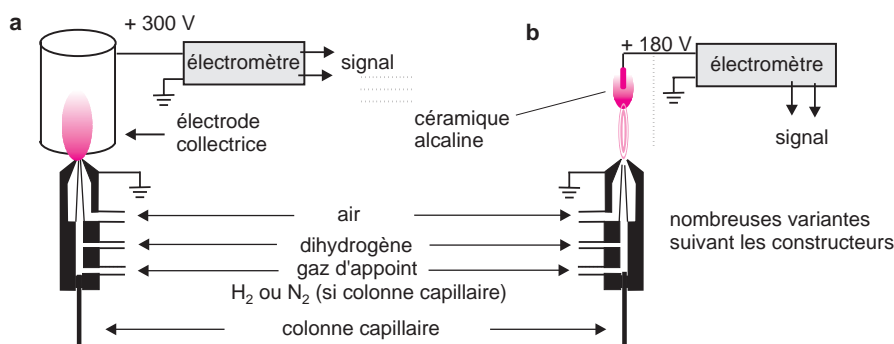


Figure 3.13 Détecteurs FID (a) et NPD (b).

Les électromètres que l'on utilise pour ces détecteurs sont des dispositifs qui permettent de mesurer des intensités très petites, trop faibles pour un galvanomètre.

■ Pour évaluer la quantité globale de composés organiques volatils présents dans l'air pollué (les COV), il existe des petits instruments portables constitués, pour l'essentiel, par un détecteur à ionisation de flamme, ce qui permet de faire une mesure, sans séparation chromatographique préalable, du facteur carbone de l'atmosphère testée.

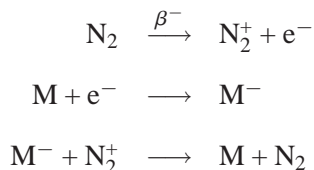
3.7.3 Détecteur thermoionique (NPD)

Ce détecteur est très sensible aux composés azotés (N) ou phosphorés (P). Il comporte un petit cylindre en céramique dopée avec un sel alcalin (ex. sulfate de rubidium) auquel on applique une tension électrique pour entretenir un petit plasma (800 °C) alimenté par combustion d'un mélange air/hydrogène (fig. 3.13). À la différence du FID la flamme est plus petite. Les composés contenant N ou P donnent, assez spécifiquement, des fragments de décomposition transformés en ions négatifs. Ces ions sont recueillis sur une électrode collectrice. Le diazote de l'air est inactif. La sensibilité est typiquement de 0,1 pg/s pour N ou P et l'étendue dynamique de 5 décades, mais elle varie beaucoup avec les réglages.

3.7.4 Détecteur à capture d'électrons (ECD)

Il s'agit d'un détecteur considéré comme sélectif car il est beaucoup plus sensible aux dérivés halocarbonés. Un courant d'azote, ionisé par un flux d'électrons généré au moyen

d'une source radioactive β^- de faible énergie (quelques mCi de ^{63}Ni), circule entre deux électrodes soumises à une ddp pulsée d'une centaine de volts (fig. 3.14), de telle sorte qu'il s'établit, au repos, un courant de base I_0 dû essentiellement aux électrons libres, très mobiles. Si des molécules M , contenant un halogène (F, Cl ou Br), traversent la zone entre les deux électrodes, elles captent une partie des électrons thermiques pour former des ions négatifs lourds, donc moins mobiles.



L'intensité recueillie suit une loi exponentielle décroissante du type $I = I_0 \exp[-kc]$. On considère cependant que la réponse varie linéairement sur une gamme dynamique de 4 décades avec le diazote comme gaz d'appoint). La présence d'une source radioactive dans ce détecteur le soumet à une réglementation particulière (visites d'inspection, localisation, maintenance). Il est souvent utilisé dans l'analyse des pesticides chlorés.

■ **Make-up.** Par nature, ces trois derniers détecteurs doivent être alimentés avec un débit gazeux de 20 mL/min au minimum, bien supérieur au débit réel des colonnes capillaires, pour donner une réponse correcte et augmenter leur sensibilité. Ce débit est atteint en mélangeant en sortie de colonne un gaz d'appoint, identique ou différent (tel le diazote) de celui qui sert de phase mobile. Cette opération est désignée par le terme *make-up*.

3.7.5 Détecteur à photo-ionisation (PID)

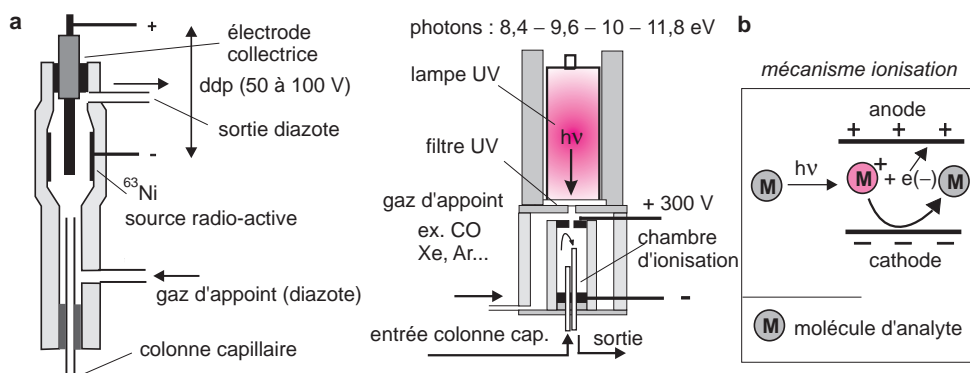


Figure 3.14 Détecteurs à capture d'électrons (a) et détecteur à photo-ionisation (b).

Le détecteur à capture d'électrons doit être installé dans un emplacement ventilé par suite de la présence de la source radioactive. Le détecteur à photoionisation comporte une source UV dont on peut sélectionner l'énergie des photons émis par un filtre adéquat de façon à ne pas ioniser le gaz vecteur, mais les seules molécules du composé élué ($M + h\nu \rightarrow M^+ + e^-$), par exemple LiF pour 11,8 eV, MgF_2 pour 9,6 – 10 eV, saphir pour 8,4 eV. Au contact des électrodes les molécules redeviennent neutres. Cette ionisation est donc réversible. Le gaz d'appoint permet une circulation optimale.

Ce détecteur assez sélectif mais peu répandu, convient aux hydrocarbures ainsi qu'aux dérivés contenant S ou P. Le principe consiste à irradier le composé élué avec une lampe UV émettant des photons très énergétiques (de 8,4 à 11,8 eV). La photo-ionisation se produit quand l'énergie du photon est supérieure à l'énergie de 1^{re} ionisation du composé (fig. 3.14). Ainsi un photon de 9,6 eV pourra ioniser le benzène ($PI_1 = 9,2$ eV) mais non l'isopropanol ($PI_1 = 10,2$ eV) qui sera donc peu visible sur le chromatogramme. La collecte des électrons libérés par une électrode reliée à la borne d'un électromètre permet des mesures de concentrations.

Il s'agit d'un détecteur qui peut fonctionner à plus de 400 °C et qui n'est pas destructif, l'ionisation étant réversible et ne touchant qu'une faible fraction des molécules de chaque composé.

3.8 DÉTECTEURS CONDUISANT À DES DONNÉES STRUCTURALES

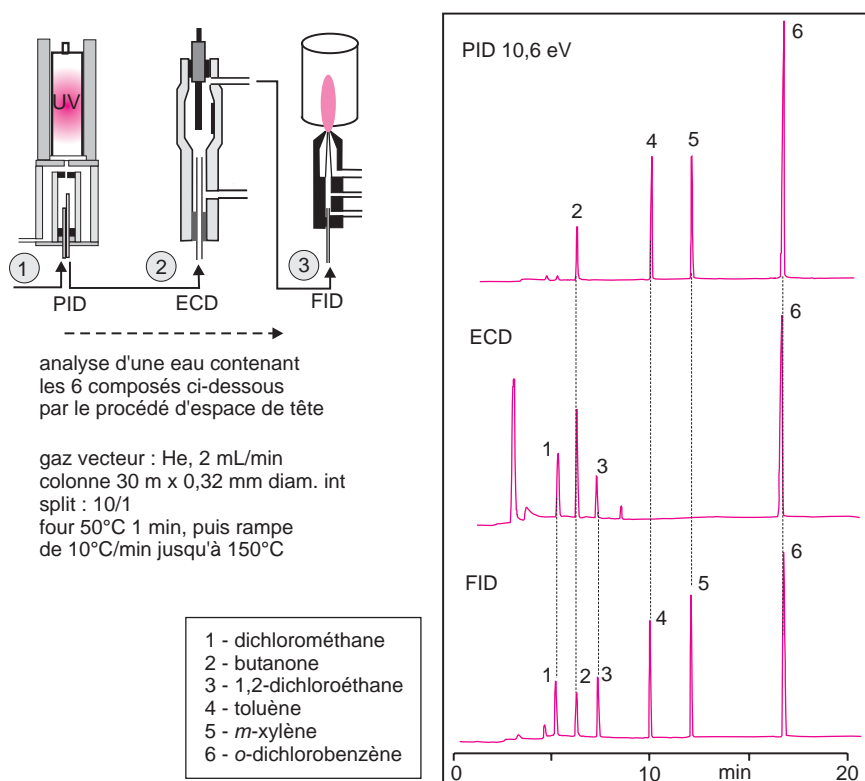


Figure 3.15 Association de trois détecteurs en série.

À la sortie d'une colonne capillaire on peut installer en série ou en parallèle, selon que le détecteur détruit ou non l'échantillon, plusieurs détecteurs de principes différents. Chromatogrammes du mélange injecté, obtenus en sortie de chaque détecteur. On remarquera que la sélectivité varie beaucoup d'un détecteur à un autre.

Les détecteurs précédents ne donnent pas d'informations sur la nature des composés élués, tout au plus sont-ils sélectifs. L'identification repose donc sur un étalonnage préalable des temps de rétention ou sur l'utilisation des indices de rétention (cf. § 3.10). Lorsque le chromatogramme présente des pics rapprochés, des confusions de composés peuvent se produire. Pour y remédier, on peut soit associer plusieurs détecteurs complémentaires (fig. 3.15), soit choisir des détecteurs permettant d'avoir des informations spectrales ou relatives à la composition élémentaire des analytes. On dispose alors à la fois du temps de rétention et de caractéristiques propres aux composés. Ces détecteurs reposent sur des méthodes indépendantes d'analyse, dont les résultats sont d'autant plus fiables que les composés ont été bien séparés par la colonne.

3.8.1 Détecteur à émission atomique

Les composés en sortie de colonne débouchent dans un plasma à micro-ondes dont la température est suffisante pour créer les conditions rencontrées dans un appareil à émission atomique (cf. chapitre 14). Chaque atome présent dans les solutés élués donne des radiations caractéristiques qui permettent de l'identifier (fig. 14.8).

3.8.2 Autres détecteurs

En adaptant en sortie de colonne un *détecteur de masse* (spectromètre de masse basse résolution, cf. chapitre 16), on obtient le spectre de fragmentation de chacun des composés élués. À partir du courant ionique total (*TIC*), on peut tracer le chromatogramme représentatif des composés élués. En sélectionnant un ion particulier (technique *SIM*), on obtiendra un chromatogramme sélectif. Bien que cette méthode conduise à une sensibilité moindre qu'avec les détecteurs classiques, elle est devenue irremplaçable dans nombre de dosages actuels, notamment dans les analyses de l'environnement. Elle exige néanmoins l'utilisation de colonnes performantes ($DI = 0,1$ à $0,2$ mm) et à ressuage ultrafaible. De même, avec un *détecteur infrarouge*, on obtient le spectre du moyen infrarouge (cf. chapitre 10) et avec un *détecteur ultraviolet*, un spectre ultraviolet (cf. chapitre 9) de chaque composé élué.

On entre ici dans le domaine des méthodes couplées, largement utilisées pour doser les traces. Les deux modes de détection ci-dessus peuvent être réunis dans une même installation à la suite d'une CPG à colonne capillaire.

3.9 CHROMATOGRAPHIE RAPIDE

D'une manière générale, la chromatographie est une méthode lente d'analyse. Les temps de rétention dépassent encore souvent une heure quand on cherche à séparer tous les constituants des mélanges complexes. Pour raccourcir ces temps on peut agir sur différents paramètres. Le plus évident consiste à utiliser une colonne plus courte et pour ne pas perdre en efficacité, diminuer le diamètre de la colonne capillaire (cf. relation 1.33). On choisit de plus un film de phase stationnaire de faible épaisseur ($0,1$ μm) et on opère en programmation de température avec une rampe importante (ex. 100 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$), ce qui est possible avec les instruments et les colonnes actuels. On passe ainsi dans le domaine de la *chromatographie rapide*.

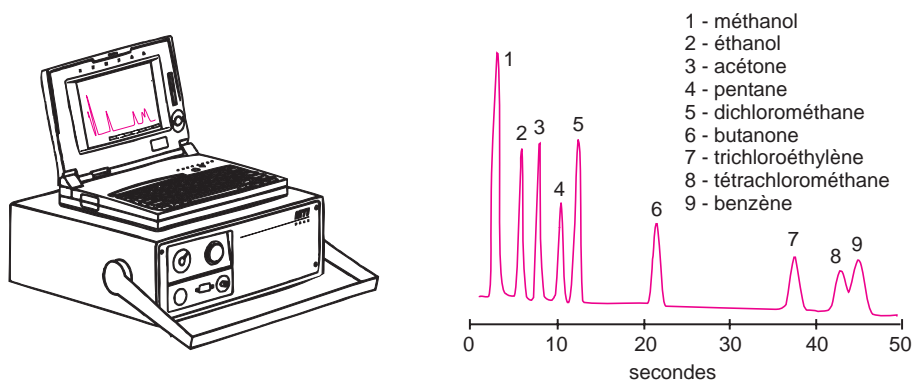


Figure 3.16 Chromatographes miniaturisés.

En haut : micro-chromatographe conçu pour les analyses sur le terrain des gaz et autres composés volatils. Exemple de chromatogramme obtenu avec cet appareil (reproduit avec l'autorisation de la société SRA (Agilent-Technologies)). En bas : appareil à colonne capillaire et détecteur par photo-ionisation, d'un poids de 4 kg environ avec la réserve incorporée de gaz vecteur (CO_2). Cet appareil est principalement destiné aux analyses de la pollution de l'air par les composés organiques volatils (les COV). (reproduit avec l'autorisation de la société Photovac).

Pour les composés volatils et avec des conceptions différentes de colonne, recouverte d'une gaine faisant office de résistance, on peut augmenter encore plus rapidement la température ($200\text{ }^{\circ}\text{C}/20\text{ s}$). Les temps de rétention diminuent fortement (fig. 3.17). Ce type de *chromatographie à très grande vitesse* est utilisée dans les analyses de contrôle.

■ Le détecteur doit pouvoir suivre sans retard les variations rapides de concentration au moment de l'élution de chaque analyte. Pour la détection par spectrométrie de masse, il y a lieu d'être attentif à la vitesse de balayage du rapport m/z , un balayage séquentiel trop lent aboutissant à un document sur lequel la concentration dans la chambre d'ionisation n'est pas la même d'une extrémité à l'autre de l'enregistrement. Les TOF (cf. 16.5) ne présentent pas cet inconvénient.

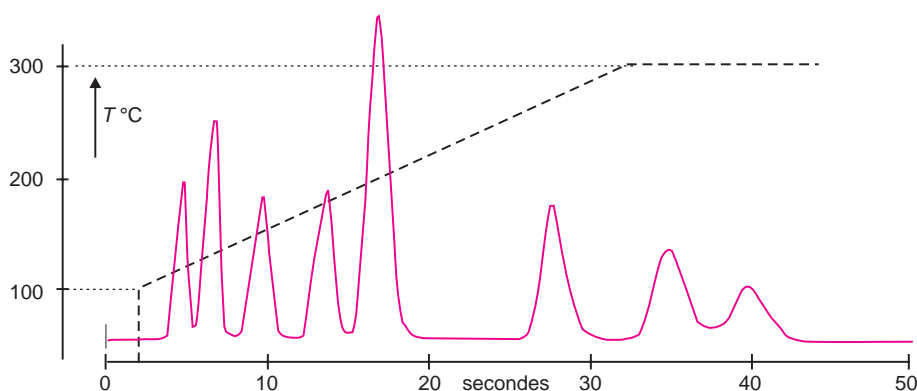


Figure 3.17 Chromatogramme à grande vitesse.

Sur le graphe figure également la programmation de température de la colonne.

■ Il existe des micro-chromatographes portatifs pour l'analyse rapide des gaz et produits volatils d'un poids de quelques kg seulement. Bien que comportant une réserve de gaz vecteur pour assurer leur autonomie, leur encombrement reste faible (fig. 3.16). Certaines pièces sont obtenues par micro-usinage d'éléments en silicium. Une courte colonne capillaire (5 m) est insérée dans une gaine métallique servant de résistance qui permet une montée en température rapide pouvant atteindre $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{s}$. L'efficacité (N) est assez faible mais le gradient de température permet d'optimiser la sélectivité entre les composés.

3.10 INDICES DE RÉTENTION ET CONSTANTES DES PHASES STATIONNAIRES

L'introduction de ces paramètres a au moins trois objectifs :

- Caractériser tout composé par une grandeur plus générale que son temps de rétention dans des conditions définies. Il en résulte le *système des indices de rétention* qui est un moyen efficace et peu coûteux pour éviter certaines erreurs d'identification.
- Suivre l'évolution dans le temps des colonnes et par suite leurs performances.

► Classer entre elles les phases stationnaires connues pour faciliter le choix d'une colonne bien adaptée pour tout problème nouveau de séparation, sachant que la polarité ou la nature chimique d'une phase stationnaire ne permet pas, seules, de prévoir sa réelle aptitude séparatrice. On examine pour cela le comportement des phases stationnaires vis-à-vis de quelques composés de référence. On aboutit aux *constantes des phases stationnaires*.

3.10.1 Droite de Kovats

Pour déterminer les indices de rétention on met à profit la propriété générale suivante :

Quand on injecte un mélange constitué de composés appartenant à une série homologue de n -alcane sur une colonne maintenue en régime isotherme, le chromatogramme qui en résulte est tel que les logarithmes des temps de rétention réduits $t'_{R(n)}$ croissent linéairement avec le nombre n d'atomes de carbone des n -alcane correspondants (fig. 3.18). En reportant sur un graphe n et $\log t'_{R(n)}$ on obtient, en effet, des points bien alignés :

$$\log (t_R(n) - t_M) = \log t'_{R(n)} = a \cdot n + b \quad (3.3)$$

$t'_{R(n)}$ correspond au temps de rétention de l'alcane ayant n atomes de carbone, diminué du temps mort t_M ; a et b sont des coefficients numériques. La pente de la droite obtenue dépend de la colonne dans sa globalité et des conditions de réglage du chromatographe

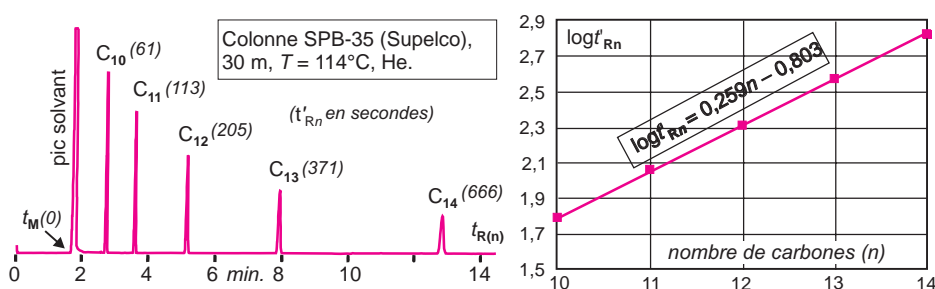


Figure 3.18 Droite de Kovats.

Chromatogramme en régime isotherme d'une série de 5 n -alcane ($C_{10} - C_{14}$) et droite de Kovats correspondante dans les conditions d'analyse précisées.

■ Cette relation découle d'une autre relation linéaire connue en thermodynamique entre la variation de l'énergie libre et la constante d'équilibre K , ($\Delta G = -RT \ln K$), pour une famille homologue de composés, dont chaque terme diffère du précédent par un CH_2 supplémentaire. Sachant que $K = k\beta$, soit $t'_R = K t_M / \beta$, il en résulte que $\log t'_R$ croît comme $\ln K$ au sein de la famille homologue : $\ln t'_R = \ln K + (\ln t_M / \beta)$.

3.10.2 Indice de rétention de Kovats d'un composé.

Sans changer les conditions de réglage de l'appareil, on injecte ensuite un composé (X). Le nouveau chromatogramme obtenu va permettre de calculer I_X , *indice de rétention de Kovats* de (X) sur la colonne considérée : celui-ci est égal au produit par 100 du nombre apparent d'atomes de carbone de l'« alcane théorique » ayant le même temps de rétention réduit.

Deux méthodes sont utilisées pour trouver le nombre n_X de carbones équivalents de (X) :

- La première qui repose sur l'équation de la droite de Kovats obtenue précédemment (fig. 3.18) et permet de calculer n_X (donc I_X) par utilisation d'un tableur par exemple.
- La seconde, qui permet de calculer directement I_X à partir des temps de migration réduits des deux n -alcane (à n et $n + 1$ C) qui encadrent (X) sur le chromatogramme :

$$I_X = 100n + 100 \frac{\log t'_{R(X)} - \log t'_{R(n)}}{\log t'_{R(n+1)} - \log t'_{R(n)}} \quad (3.4)$$

À la différence de la droite de Kovats, les indices de rétention ne dépendent que de la phase stationnaire et non des conditions de réglage du chromatographe. Ils s'affranchissent en particulier des temps de rétention.

Pratiquement, pour s'assurer de l'identité des conditions expérimentales pour les deux injections, on co-injecte le composé X avec le mélange des n -alcane (fig. 3.9 et 3.19).

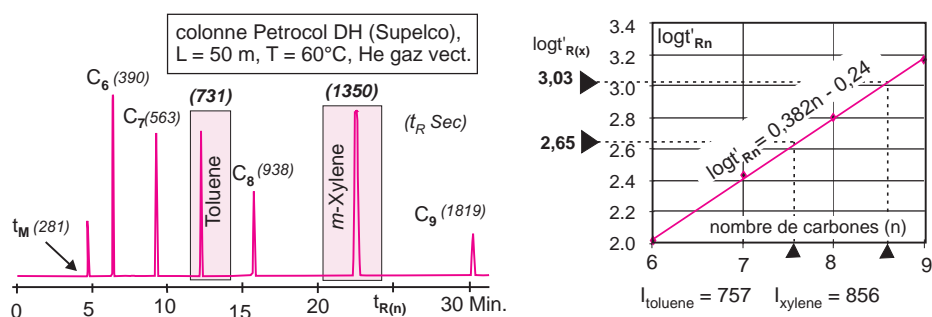


Figure 3.19 Indices de rétention de Kovats ($I = 100 n_X$) sur une colonne en régime isotherme.

Le nombre de carbones équivalent n_X , est trouvé à partir du logarithme du temps de rétention réduit $t'_{R(X)}$. Le chromatogramme correspond à l'injection d'un mélange de 4 n -alcane et 2 hydrocarbures aromatiques. Les valeurs en italiques correspondent aux temps de rétention en secondes. En injectant périodiquement ce même mélange, la modification des indices de Kovats de ces hydrocarbures permet de suivre l'évolution des performances d'une colonne. En programmation de température on peut encore tracer cette droite en utilisant une formule corrigée, mais la précision est moins bonne.

■ Le chromatogramme, qui permet d'obtenir la droite de Kovats de la phase stationnaire étudiée, peut servir accessoirement à juger des performances que l'on peut attendre de la colonne. On utilise pour cela le nombre de séparation, paramètre encore appelé trennzahl (TZ), calculé à partir des formules 3.5 ou 3.6. Les deux temps de rétention se rapportent à deux alcane successifs (n et $n + 1$ atomes de carbone), ou à deux composés de même type. Le nombre de séparation indique combien de composés seraient convenablement séparés par la colonne dans l'intervalle arbitraire d'élution de ces deux composés. On choisit les alcane qui encadrent le temps d'élution du composé à analyser. Sur le chromatogramme de la fig. 3.19, le TZ est de l'ordre de 30.

$$TZ = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\delta_1 + \delta_2} - 1 \quad (3.5)$$

ou encore :

$$TZ = \frac{R}{1,18} - 1 \quad (3.6)$$

Il existe quelques tables des indices de rétention des composés courants sur les phases les plus connues. Si on dispose de plusieurs indices de rétention d'un même composé, obtenus avec des phases différentes, on a alors un ensemble unique de valeurs qui permet de le caractériser de manière plus certaine. Cependant, de ce point de vue, les indices de rétention n'ont pas la fiabilité de la méthode couplée CPG/SM (cf. § 3.8.2) très générale d'emploi, mais en revanche demandant un matériel plus coûteux.

■ **Temps de rétention imposé.** L'identification des composés dont les temps de rétention sont voisins et les spectres de masse presque identiques (certains types d'isomères) est évidemment difficile. Une méthode actuelle consiste à choisir un standard interne ou un composé dont on sait qu'il est présent dans tous les échantillons à analyser et par l'intermédiaire du logiciel d'analyse on bloque la valeur de son temps de rétention pour les différentes analyses, mêmes si elles sont effectuées avec des appareils différents. Ceci a pour effet de conserver également les temps de rétention des autres composés du mélange, facilitant leur identification. Cette approche qui évite de recourir aux indices de rétention est possible avec les appareils modernes. Elle est connue du sigle RTL (Retention Time Locking).

3.10.3 Constantes de McReynolds des phases stationnaires

Pour caractériser le comportement d'une phase stationnaire on compare les indices de Kovats de cinq composés témoins appartenant à des types structuraux différents sur la phase étudiée d'une part et sur le squalane d'autre part, phase qui a été choisie comme référence pour ce calcul. Les cinq indices pour la colonne au squalane, la seule phase apolaire qui soit reproductible car formée d'un produit pur, ont été établis une fois pour toutes (tab. 3.1).

Les cinq constantes de McReynolds pour une phase donnée, s'obtiennent en calculant les différences observées pour chacune des substances testées entre l'indice de Kovats sur squalane (I_{Squalane}) et l'indice sur la phase étudiée (I_{phase}) :

$$\text{Constante de McReynolds} = \Delta I = (I_{\text{phase}} - I_{\text{Squalane}}) \quad (3.7)$$

La somme de ces 5 valeurs calculées d'après 3.7, a été retenue pour définir la polarité globale de la phase testée.

■ On admet que chacun des composés test apporte une information particulière sur la phase stationnaire. Le benzène pour l'effet inducteur, la pyridine pour l'effet accepteur H^+ , le butanol pour les liaisons hydrogène, le nitropropane pour les interactions dipolaires...

Ces constantes, qui dépendent des structures moléculaires, permettent d'apprécier les forces d'interaction soluté/phase stationnaire en fonction de quelques grandes classes de composés. Un indice dont la valeur est élevée indique que la phase étudiée retient fortement les composés porteurs de la fonction organique correspondante, ce qui normalement conduit à une sélectivité accrue. Ainsi, pour séparer un hydrocarbure aromatique d'un mélange contenant des cétones, on choisira une colonne pour laquelle la constante pour le benzène est assez différente de celle de la butanone. Ces différences d'indices de rétention figurent dans la plupart des catalogues des fabricants à l'usage des chromatographistes (tab. 3.1). Les constantes de McReynolds ont remplacé les constantes de Rohrschneider, basées sur le même principe mais utilisant certains composés de référence différents.

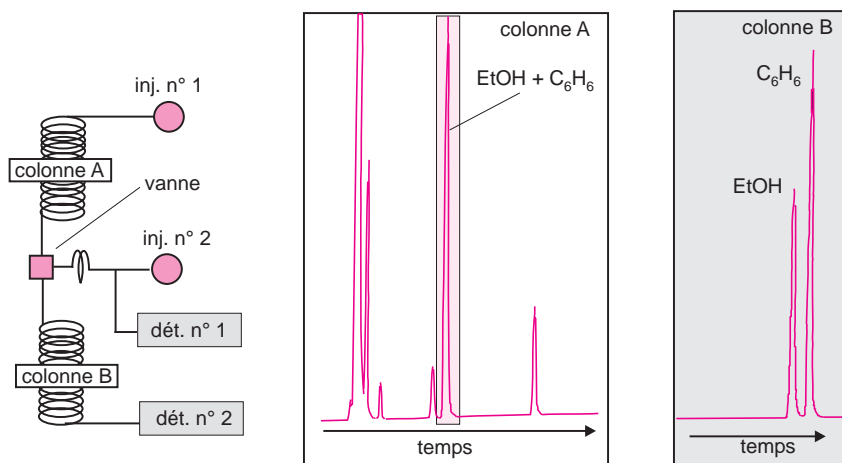
Tableau 3.1 Constantes de McReynolds (ΔI) de quelques phases stationnaires.

Phase stat.	benzène	1-butanol	2-pentanone	nitropropane	pyridine
Squalane	0	0	0	0	0
SPB-Octyl	3	14	11	12	11
SE-30 (OV-1)	16	55	44	65	42
Carbowax 20M	322	536	368	572	510
OV-210	146	238	358	468	310
indice de Kovats des 5 composés témoins (X' Y' Z' U' S') sur squalane					
I / squalane	653	590	627	652	699

■ Les calculs précédents des indices de rétention impliquent que les mesures soient effectuées dans des conditions isothermes. En programmation de température, ils donnent encore de bons résultats en substituant, dans la formule 3.7, les temps de rétention aux logarithmes correspondants.

3.11 CHROMATOGRAPHIE « MULTIDIMENSIONNELLE »

En réunissant dans un montage particulier deux colonnes ayant des sélectivités différentes on peut associer des mécanismes de séparation distincts (fig. 3.20). Le dispositif permet de recueillir une fraction non résolue à l'issue de la première colonne pour la ré-injecter dans la seconde colonne. L'installation comporte donc deux détecteurs et une vanne d'introduction entre les deux colonnes.

**Figure 3.20** Chromatographie bidimensionnelle et exemple de séparation en suivant ce procédé.

Agencement des deux colonnes avec les deux détecteurs et la vanne d'injection intermédiaire. Dans l'exemple ci-dessus, la colonne A, polaire, ne sépara pas l'éthanol du benzène. La fraction correspondante est ré-injectée dans la colonne B, non polaire, dans laquelle la séparation a lieu (d'après un document Thermoquest).

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.agilent.com

www.perkinelmer.com

www.shimadzu.com

www.thermo.com/finnigan

www.varianinc.com

www.chromatosud.com

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 3.1

La méthode la plus connue d'estimation du temps mort t_M consiste à mesurer le temps de rétention d'un composé non retenu. On propose ici une autre méthode de calcul du temps mort t_M faisant appel à la relation utilisée dans l'établissement des indices de rétention, à savoir que dans une série homologue de composés organiques on peut écrire, si la température de la colonne ne varie pas :

$$\log(t_R - t_M) = a \cdot n + b$$

t_R représente le temps de rétention du composé à n atomes de carbone, a et b sont des constantes qui dépendent de la classe des solutés et de la phase stationnaire choisie.

a) Rappeler les paramètres de caractérisation chromatographiques qui exigent de connaître t_M . Quel est le composé habituellement utilisé pour déterminer t_M ?

b) Calculer, avec la méthode ci-dessus, t_M à partir de l'expérience suivante : on injecte un mélange des alcanes linéaires à 6, 7 et 8 atomes de carbone. Les temps de rétention sont respectivement de 271, 311 et 399 s en régime isotherme à 80 °C (longueur de la colonne 25 m, $d_C = 0,2$ mm, $e_f = 0,2$ µm, phase stationnaire à base de polysiloxanes).

c) Connaissant l'indice de Kovats de la pyridine sur squalane qui est de 695, quelle est la constante de McReynolds de ce composé sur la colonne étudiée, sachant que dans les conditions de l'expérience, son temps de rétention est de 346 s ?

Exercice 3.2

Dans une expérience de CPG, on injecte un mélange de n -alcanes (à n atomes de carbone, n étant variable) et de 1-butanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$) sur une colonne en régime isotherme comportant une phase stationnaire de type diméthylpolysiloxane. L'équation de la droite de Kovats déterminée à partir du chromatogramme est :

$$\log t'_R = 0,39 n - 0,29 \quad (t'_R \text{ exprimé en secondes}).$$

Le butanol a un temps de rétention corrigé de 168 s. Sachant que son indice de rétention (de Kovats) sur colonne squalane est de 590, en déduire la constante de McReynolds du butanol sur cette colonne.

Exercice 3.3

Montrer que, pour une colonne capillaire, le débit moyen peut être calculé à partir de la formule suivante :

$$D_{\text{mL/min}} = \bar{u}_{\text{cm.s}} \times 0,47 d_C^2 (\text{mm})$$

\bar{u} représente la vitesse linéaire de la phase mobile dans la colonne de diamètre interne d_C .

Exercice 3.4

On donne ci-après un tableau des valeurs du facteur de capacité k (en italiques) pour quatre gaz de raffinerie, étudiés à trois températures différentes sur une même colonne capillaire ($L_C = 30$ m, diam. int. $DI = 250 \mu\text{m}$) dont la phase stationnaire est du type SE-30. Le chromatographe est muni d'un accessoire cryogénique.

composé	temp. Eb. (°C)	température de la colonne (°C)		
		-35	25	40
éthylène	- 104	<i>0,249</i>	<i>0,102</i>	<i>0,0833</i>
éthane	- 89	<i>0,408</i>	<i>0,148</i>	<i>0,117</i>
propène	- 47	<i>1,899</i>	<i>0,432</i>	<i>0,324</i>
propane	- 42	<i>2,123</i>	<i>0,481</i>	<i>0,352</i>

- D'après l'ordre d'éluion peut-on dire si la phase SE-30 est polaire ou non ?
- Calculer le facteur de sélectivité pour le couple propène-propane aux trois températures indiquées.
- Pourquoi k diminue-t-il lorsque la température croît, pour un même composé ?
- Quel est le nombre de plateaux théoriques de la colonne pour le propane à 40 °C, sachant qu'à cette température le facteur de résolution pour le couple propène-propane est égal à 2 ? Calculer la HEPT correspondante.
- Quelle serait la valeur théorique minimale de l'HEPT pour le propane à 40 °C ?

Exercice 3.5

Dans une série d'analyses par CPG, on cherche à déterminer l'influence de la longueur de la colonne sur certains paramètres du chromatogramme. Toutes les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions de température et de débit du gaz vecteur.

L (m)	$a = \sqrt{L}$	T_R (min)	T_R / L	R	R/a
15		3,7		2,05	
30		7,5		2,91	
60		15,3		4,15	

- Compléter le tableau.
- Quelle relation simple peut-on, aux incertitudes de mesures près, envisager entre temps de rétention et longueur de la colonne ?
- Quelle relation simple peut-on, aux incertitudes de mesures près, envisager entre résolution et racine carrée de la longueur de la colonne ?

- d) En admettant que les deux pics utilisés pour déterminer la résolution ont pratiquement même largeur à mi-hauteur déduire des questions précédentes une relation entre largeur à mi-hauteur d'un pic et longueur de la colonne et une relation entre efficacité théorique de la colonne et longueur de celle-ci.
- e) Les deux pics utilisés pour calculer R ont des temps de rétention respectivement égaux à 8,3 min et 9,7 min avec la colonne de longueur égale à 60 m. Calculer la largeur à mi-hauteur de ces pics (même approximation qu'à la question d), ainsi que l'efficacité théorique de la colonne pour le soluté dont le temps de rétention est de 8,3 min.
- f) Calculer l'efficacité théorique des colonnes de 15 et 30 m pour le même soluté.

Chapitre 4

Chromatographie ionique

La chromatographie ionique (CI) est une technique qui s'apparente à la CLHP mais qui présente cependant suffisamment de particularités, tant au niveau du principe de la séparation que de certaines méthodes de détection, pour en faire l'objet d'une étude à part. Elle est adaptée à la séparation des ions minéraux et de toutes sortes de molécules organiques à la condition qu'elles soient polaires. La phase mobile est constituée par un milieu aqueux ionique et la phase stationnaire par un solide qui se comporte comme un échangeur d'ions. Les modes de détection classiques par absorbance ou fluorescence étant souvent mal adaptés à ces analytes, on utilise des détecteurs mettant à profit la conductance des solutions. Les applications actuelles de la CI débordent largement les analyses des cations ou des anions qui ont fait ses premiers succès.

4.1 PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE IONIQUE (CI)

Cette technique de chromatographie est orientée vers la séparation des ions et des composés polaires. Pour cela on utilise des colonnes contenant des phases stationnaires comportant des sites ioniques pour qu'il se crée des interactions dipolaires avec les analytes à séparer. Plus grande est la charge portée par un soluté, plus ce dernier est retenu par la phase stationnaire. Ce processus d'échange est lent, comparé à ceux qui régissent les autres types de chromatographie. Pour les composés organiques, il se superpose au mécanisme précédant les effets déjà décrits en CLHP avec les colonnes à polarité inversée.

■ Parmi les composés séparables en CI on trouve les mono ou polysaccharides, les nucléosides et nucléotides, les acides carboxyliques les anions et cations organiques ou minéraux divers (métaux de transition, terres rares)...

Les appareils sont constitués de modules indentiques à ceux déjà rencontrés en CLHP (fig. 4.1). Les parties au contact de la phase mobile doivent être en matériaux inertes compte tenu de l'agressivité des solutions aqueuses acides ou basiques qui servent d'éluants.

La progression et la séparation des composés de l'échantillon reposent sur des phénomènes d'échanges ioniques. On distingue deux situations :

- Si on cherche à séparer des espèces cationiques (type M^+), on choisit une colonne, appelée *cationique*, dont la phase stationnaire comporte des sites aptes à échanger les cations. Une telle phase est constituée par exemple par un polymère greffé avec des groupements $-SO_3H$ (c'est par conséquent l'équivalent d'un polyanion).

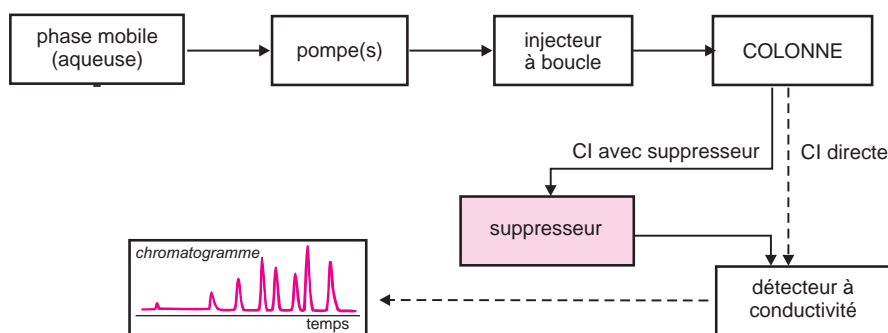


Figure 4.1 Schéma de principe d'une installation de chromatographie ionique.

On retrouve l'architecture modulaire classique de la chromatographie liquide, avec pour différence de pouvoir utiliser un mode de détection original basé sur la conductance des solutions. Cependant la nature et la concentration ionique de certaines phases mobiles sont à l'origine de difficultés avec ce mode de détection. On fait alors appel à un montage particulier comportant un « suppresseur », dispositif intercalé entre la colonne et le détecteur, qui a pour rôle d'éliminer les ions de l'éluant par réaction de type acido-basique.

- En revanche, si on cherche à séparer des anions (type A^-) on choisit une colonne dite *anionique*. Celle-ci est obtenue par exemple à partir d'un polymère comportant des groupements ammonium).

Pour comprendre le mécanisme d'une séparation, prenons pour exemple une colonne anionique comportant des groupements ammonium quaternaire, en équilibre avec une phase mobile riche en anions hydrogénocarbonates (contre-anions). Ainsi, tous les sites cationiques de la phase stationnaire se trouvent appariés avec les ions de la phase mobile (fig. 4.2).

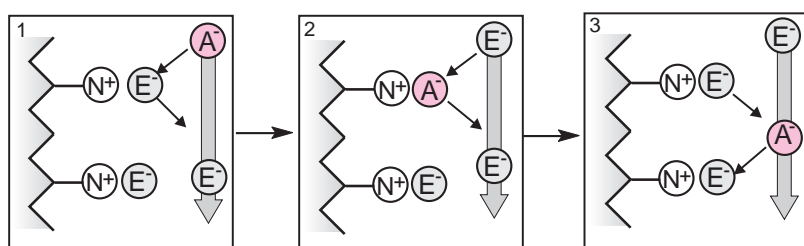
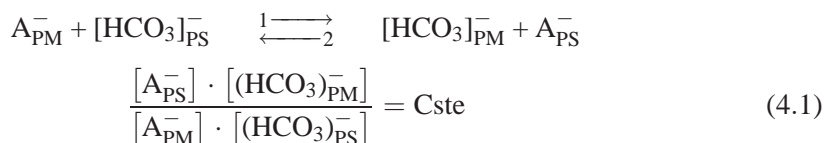


Figure 4.2 Illustration de la progression d'un anion A^- au contact d'une phase stationnaire ammonium appariée avec un contre-anion E^- de la phase mobile.

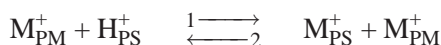
L'ion E^- (généralement l'ion hydrogénocarbonate) est fixé sur la phase stationnaire. L'anion A^- (ion chlorure par exemple), qui est dans la phase mobile vient prendre la place de l'ion E^- . Ensuite, l'éluant produit une inversion du sens de la réaction d'équilibre en régénérant, au niveau du site considéré, la phase stationnaire liée à un ion E^- (ou un autre ion de même type). La progression de A^- dans la colonne dépendra de son affinité avec les sites ioniques de la colonne.

Lorsqu'un anion A^- , apporté par l'échantillon, est entraîné par l'éluant, une suite d'équilibres réversibles se produit, régis par une équation d'échange qui détermine sa répartition entre les deux phases, mobile (PM) et stationnaire (PS). Le sens 1 correspond à la fixation de l'anion A^- sur la PS et le sens 2 à son retour dans la PM, donc à sa progression dans la colonne.



Cet équilibre représente la sélectivité α entre les deux anions vis-à-vis du cation de la phase stationnaire.

À partir d'une colonne de type cationique, on peut décrire une situation calquée sur la précédente (PS correspond par ex. à une phase de type Polym-SO₃H fortement acide) :



Ce phénomène d'échange qui permet de retenir les espèces polaires sur la résine est connu sous le nom d'extraction en phase solide (fig. 4.3). Si l'échantillon contient deux ions X et Y et si $K_Y > K_X$, Y est plus retenu par la colonne que X.

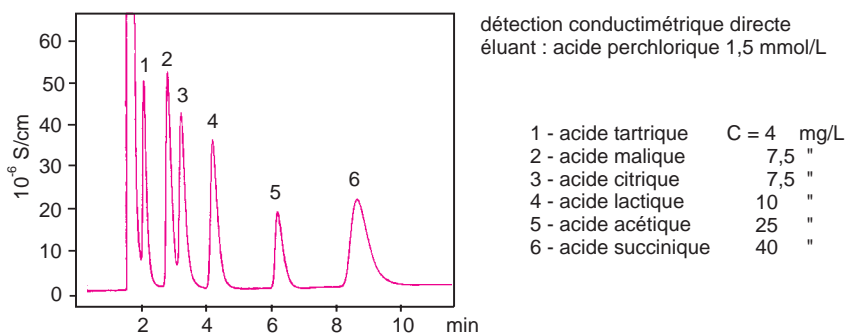


Figure 4.3 Séparation de quelques acides organiques avec une colonne cationique.

4.2 PHASES STATIONNAIRES

Les phases stationnaires doivent satisfaire aux impératifs de distribution granulométrique étroite (monodisperse), de grande surface spécifique, de résistance mécanique, de bonne tenue aux pH acides ou basiques et assurer un transfert rapide des ions.

4.2.1 Copolymères de synthèse

Les phases stationnaires les plus connues sont obtenues par copolymérisation styrène/divinylbenzène afin d'obtenir des phases réticulées, résistantes à l'écrasement. Elles se présentent sous forme de particules sphériques d'un diamètre de quelques micromètres (fig. 4.4). Ces particules sont ensuite greffées pour en faire des polyanions ou polycations.

Pour greffer des groupements SO_3H , on fait réagir de l'acide sulfurique concentré, sachant que seuls les noyaux aromatiques accessibles au réactif seront transformés. On obtient une phase très acide — dite cationique forte — dont l'anion est fixé sur le copolymère et le cation est échangeable avec d'autres espèces cationiques présentes dans l'éluant. La capacité d'échange, indépendante du pH de la solution, est de quelques mmol/g.

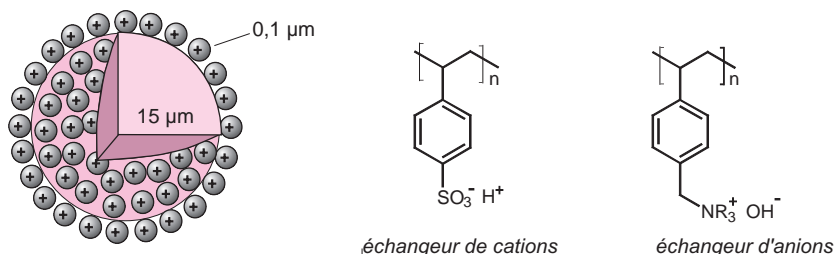


Figure 4.4 Phases stationnaires en CI.

Schéma d'une particule sphérique de polystyrène à usage d'échangeur de cations. Matrice de polystyrène transformée en résine échangeuse de cations (ex. DOWEX® 4 ou en résine échangeuse d'anions (ex. DOWEX® MSA-1, ou Permutite® si $R = \text{Me}$).

Pour réaliser une résine anionique en partant du même copolymère, on commence par une chlorométhylation, ce qui revient à fixer $-\text{CH}_2\text{Cl}$ (obtention de la « résine de Merrifield ») puis on fait réagir une amine tertiaire ou secondaire selon la basicité souhaitée de la phase stationnaire.

■ Une phase stationnaire faiblement basique comme Polym- NMe_2 donne au contact de l'eau une phase faiblement ionisée ($\text{Polym-NMe}_2\text{H} + \text{OH}^-$) surtout si on est en milieu alcalin. En revanche, en milieu acide, elle apparaîtra comme une phase fortement basique dont la surface active sera fortement ionisée : ($\text{Polym-NMe}_2\text{H} + \text{Cl}^-$). Les résines de ce type ont une capacité d'échange qui varie avec le pH.

4.2.2 Silices greffées

Le gel de silice peut également servir de support pour fixer, par des liaisons covalentes, des chaînes alkylphényles porteuses de groupements sulfonés ou ammonium quaternaire. La démarche est semblable à celle qui est suivie pour obtenir les silices greffées de la CLHP. Ces phases associent les propriétés de la chromatographie ionique à celles de la CLHP. La séparation repose à la fois sur les coefficients ioniques et sur les coefficients de partage.

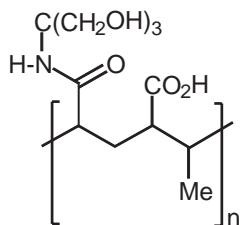


Figure 4.5 Copolymérisation de deux monomères monoéthyléniques (un acide et un trihydroxyamide).

Exemple de structure obtenue (CM-TRISACRYL M® de IBF-France). S'agissant d'un acide faible, une phase de ce type n'est pas utilisable à des pH acides, puisqu'elle n'est plus sous forme ionisée.

■ Un autre procédé pour obtenir ces phases stationnaires consiste à copolymériser un mélange de deux monomères acryliques, l'un de type anionique (ou cationique) choisi selon la nature de la phase désirée, et l'autre polyhydroxylé (fig. 4.5), destiné à assurer le caractère hydrophile. Mais ces résines ont un inconvénient, car leur taux de gonflement varie en fonction de la composition de la phase mobile. Elles sont réservées au domaine de la chromatographie moyenne pression, pour certaines applications biochimiques.

4.2.3 Résines pelliculaires

Un polymère appelé latex, préparé au départ d'un monomère porteur de fonctions organiques, est déposé à l'état de minuscules sphères jointives ($0,1-0,2\ \mu\text{m}$ de diamètre) pour former une pellicule continue de $1\text{ à }2\ \mu\text{m}$ d'épaisseur sur un support imperméable, constitué de microsphères de silice, de verre, ou de polystyrène de $25\text{ à }50\ \mu\text{m}$ de diamètre (fig. 4.6) propre à conduire à des équilibres rapides entre phases.

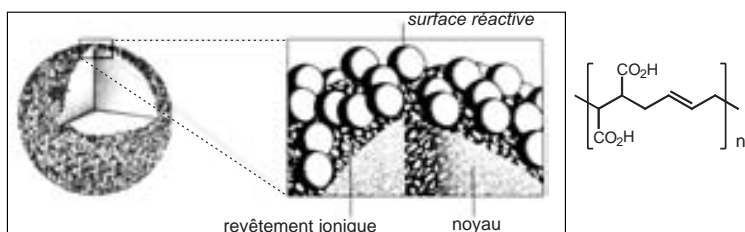


Figure 4.6 Résines pelliculaires.

Exemple de résine constituée d'un noyau dur sur lequel a été déposé un copolymère obtenu au départ d'un monomère résultant de la réaction de l'acide maléique sur le 1,3-butadiène (Reproduit avec l'autorisation de la Société Dionex).

Dans le cas du support polystyrène, le latex est fixé par des liaisons polaires. Ce latex résulte de la réaction de deux monomères insaturés tels que le 1,3-butadiène avec l'acide maléique ou le méthacrylate de 2-hydroxyéthyle. Les doubles liaisons restantes servent à durcir le matériau par réticulation.

4.3 PHASES MOBILES

Les éluants servant de phases mobiles sont des solutions aqueuses chargées d'ions salins ou organiques et, si nécessaire, d'un peu de méthanol ou d'acétone pour faciliter la dissolution de certains échantillons. Suivant le type, cationique ou anionique de la colonne, les ions de l'éluant sont apportés soit par des acides minéraux ou organiques (perchlorique, benzoïque, phtalique, méthanesulfonique...), soit par des bases (hydroxyde de potassium ou de sodium, carbonates ou bicarbonates...).

Dans ce dernier cas, les solutions d'éluant ont malheureusement tendance à se carbonater par absorption du dioxyde de carbone de l'air ambiant, ce qui perturbe progressivement les temps de rétention. Pour éviter cette contamination, on peut acquérir par exemple un générateur d'hydroxyde de potassium (KOH) qui s'intercale entre la pompe et l'injecteur du chromatographe (fig. 4.7). Connaissant le débit d'eau et l'intensité du courant d'électrolyse on règle avec précision la concentration en KOH de l'éluant et on peut même faire des séparations reproductibles avec des gradients de concentration.

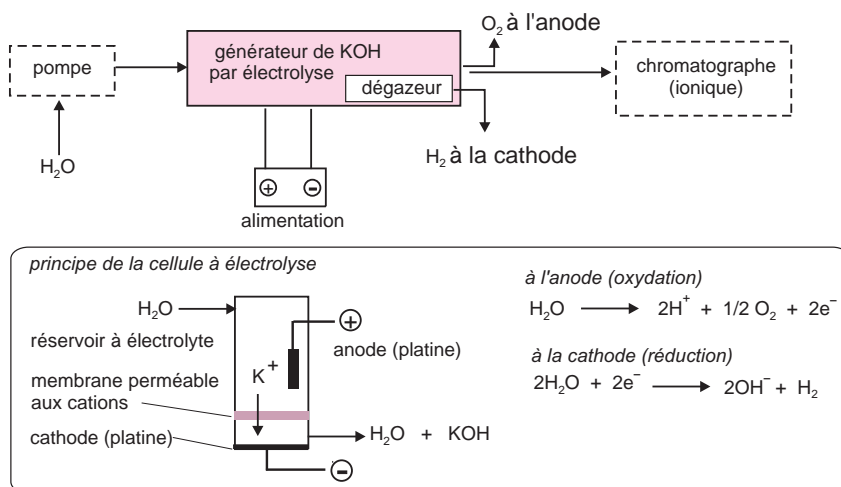


Figure 4.7 Chromatographie ionique avec générateur d'éluant à base de KOH pour séparer des anions.

Schéma montrant la position du générateur de potasse diluée (KOH) entre pompe et chromatographe. Le dioxygène formé à l'anode et le dihydrogène à la cathode, sont éliminés par un dégazeur à capillaire. Il est à noter que la pompe est alimentée en eau pure, donc ne souffre pas de la corrosion apportée par les acides ou les bases. Détail illustrant la partie active du générateur de potasse diluée de la cellule d'électrolyse (dessin exécuté à partir d'un document de la société Dionex).

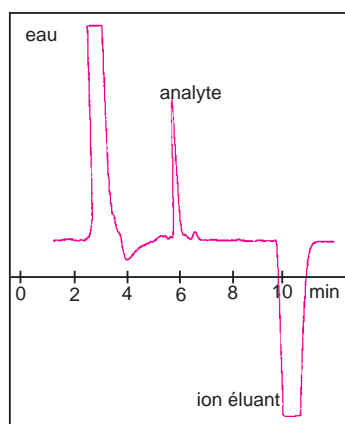


Figure 4.8 Chromatogramme faisant apparaître le pic de l'eau (2 min) et le pic système (10 min).

■ **Les pics d'éluant d'origine accidentelle.** L'ion de l'éluant (qui a pour rôle de déplacer les équilibres ioniques dans la colonne), a également un temps de rétention comme tout ion de l'échantillon dans les conditions de l'expérience. Si, au cours de l'injection, la solution aqueuse de l'échantillon ne comporte pas cet ion, il se produit un déficit en cet ion, pendant un court instant (« concentration négative »). On verra alors sur le chromatogramme un pic appelé *pic système* souvent en négatif qui correspond au temps d'éluant de l'ion éluant (fig. 4.8). Un autre artefact est dû à l'eau contenue dans l'échantillon qui génère un second pic, positif ou négatif, pour la même raison. Ce pic marque le temps mort de la chromatographie en cours.

4.4 DÉTECTEURS À CONDUCTIVITÉ

En dehors des détecteurs spectrophotométriques basés sur l'absorption ou la fluorescence dans l'UV/VIS, utilisables lorsque la phase mobile n'absorbe pas elle-même dans le domaine de mesure, on trouve un mode de détection particulier basé sur la propriété des électrolytes de conduire le courant électrique : on mesure, en sortie de colonne, la conductance (inverse de la résistance) de la phase mobile entre deux micro-électrodes. Pour pouvoir faire une mesure directe, il faut utiliser un éluant peu chargé en ions, possédant une faible conductance et disposer d'une cellule de mesure thermostatée à 0,01 °C près, étant donné l'effet prononcé de la température sur la conductance ($\sim 5\ \%/^{\circ}\text{C}$!). La cellule de mesure, disposée en aval de la colonne, est d'un volume très réduit (environ 2 μL).

On peut prévoir la sensibilité de la détection d'un ion X (valence z et conc. mol. C) à condition de connaître sa conductance équivalente (Λ_X) et celle de l'ion éluant E (Λ_E). On calcule la valeur de ΔK selon l'expression 4.2, sachant que, suivant le signe trouvé, le pic sera dit positif ou négatif :

$$\Delta K = C \cdot z \cdot (\Lambda_X - \Lambda_E) \quad (4.2)$$

■ **Conductance des solutions.** La conductance $G = 1/R$ correspond à la valeur réciproque de la résistance R mesurée entre deux électrodes entre lesquelles on maintient une ddp et qui plongent dans la solution conductrice. G s'exprime en Siemens (S). Pour un ion donné, la conductance de la solution varie comme la concentration de l'électrolyte. La relation est linéaire pour les solutions très diluées. La conductance spécifique (en $\text{S} \cdot \text{m}^{-1}$) ou conductivité k , permet de s'affranchir des paramètres de la cellule :

$$k = G \cdot K_{\text{cell}} \quad (4.3)$$

$K_{\text{cell}} = d/S$ désigne la constante de cellule (surface S et écartement d). Sa valeur n'est pas accessible par une mesure directe. On la détermine à partir d'une solution d'étalonnage dont on connaît la conductivité k . Enfin la conductance équivalente ionique ($\text{S} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$) représente la conductivité d'un ion de valence z , en solution aqueuse à 25 °C, lorsque la concentration molaire C (mol/L) tend vers 0 dans l'eau (tableau 4.1).

$$\Lambda_0 = 1000 k / C \cdot z \quad (4.4)$$

Tableau 4.1 Conductivités équivalentes de quelques ions à dilution infinie dans l'eau, à 25 °C.

cations	$\Lambda_0^+(\text{S} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}) \times 10^{-4}$	anions	$\Lambda_0^-(\text{S} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}) \times 10^{-4}$
H^+	350*	OH^-	198
Na^+	50	F^-	54
K^+	74	Cl^-	76
NH_4^+	73	HCO_3^-	45
$1/2 \text{Ca}^{++}$	60	H_2PO_4^-	33

* note : 3 500 000 en $\text{S} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$ ou 350 en $\text{S} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$.

4.5 LE SUPPESSEUR D'IONS DE L'ÉLECTROLYTE

Au sein de l'éluant fortement ionique, il peut être difficile de repérer le signal apporté par les faibles concentrations des ions de l'analyte. Pour améliorer la sensibilité de ce type de détection on intercale, entre la colonne et le détecteur, un dispositif destiné à échanger par capture les ions apportés par l'électrolyte, appelé *suppresseur*. Le but est de remplacer les ions initiaux de l'éluant par d'autres de plus faible conductivité.

Le modèle le plus simple de suppresseur consiste en une colonne de type échangeur d'ions. L'exemple suivant explique le mécanisme d'action d'un suppresseur qui contient une phase stationnaire avec des groupements fonctionnels de charge opposée à ceux de la colonne de séparation.

Supposons que l'on ait séparé un mélange contenant les cations Na^+ et K^+ avec une colonne cationique dont la phase mobile est de l'acide chlorhydrique dilué. En sortie de colonne, les ions Na^+ et K^+ sont accompagnés des ions H^+ apportés par l'acide chlorhydrique. Les ions chlorures assurent l'électroneutralité à l'ensemble du milieu. Après la colonne séparatrice, la phase mobile traverse une seconde colonne qui contient une résine anionique dont l'ion mobile est OH^- . Les ions Cl^- se fixent sur cette colonne en déplaçant les ions OH^- qui réagissent sur les ions H^+ pour donner de l'eau. En aval du suppresseur, ne subsisteront dans l'eau que les espèces (Na^+OH^-) et (K^+OH^-) plus conductrices que (Na^+Cl^-) et (K^+Cl^-) . Les ions H^+ et Cl^- auront disparu. La détection des ions Na^+ et K^+ s'en trouvera exaltée (fig. 4.9).

Ce type de suppresseur a un inconvénient, son important volume mort qui diminue l'efficacité de la séparation par un nouveau mélange des ions avant leur détection. Il doit être régénéré périodiquement et n'est utilisable qu'en mode isocratique.

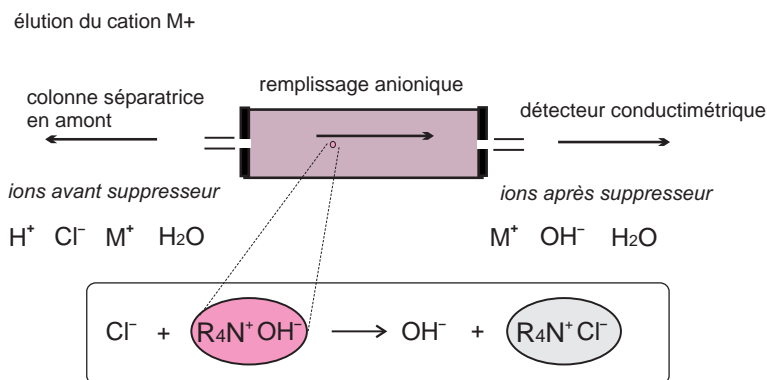


Figure 4.9 Suppresseur chimique à colonne de neutralisation.

Dans cet exemple de détection d'un cation, le suppresseur anionique purge l'éluant des ions H^+ et de la quasi-totalité des ions Cl^- , facilitant ainsi la détection du cation M^+ . On a associé à une colonne de séparation cationique (ex. ArSO_3H) un suppresseur chimique contenant une résine anionique (ex. $\text{ArCH}_2(\text{NR})_3\text{OH}$) pour neutraliser les cations de l'éluant.

Les suppresseurs à fibres ou à micromembrane ont, par la suite, pris le relais. Ils ont des volumes morts très petits, de l'ordre de $50 \mu\text{L}$, et une forte capacité ionique. Ils permettent l'élution avec gradient de concentration, la dérive de la ligne de base étant négligeable.

La figure 4.10a présente le schéma correspondant au passage d'un anion A^- en solution dans un électrolyte typique d'une colonne anionique, au travers d'un supprimeur à membrane cationique.

Plus récemment sont apparus des supprimeurs autorégénérés par réaction électrolytique. Ils comportent, soit une colonne spéciale contenant une résine régénérée par électrolyse, soit un supprimeur à membrane dont les ions régénérants sont produits *in situ* par électrolyse de l'eau. La figure 4.10b illustre le second procédé : il représente le passage d'un cation, en solution dans de l'acide chlorhydrique dilué, au travers d'un supprimeur dont la membrane est perméable aux anions.

En revanche, si le problème à résoudre est une séparation d'un mélange d'anions sur une colonne anionique (garnissage cationique), avec un l'éluant contenant de la soude diluée, on choisira une membrane perméable aux cations. Du côté cathodique, le passage des ions hydroniums vers l'électrolyte fera disparaître les ions OH^- . Du côté de l'anode, ce sont les ions Na^+ qui migreront et viendront réagir sur les ions OH^- .

4.6 ANALYSEURS D'ACIDES AMINÉS

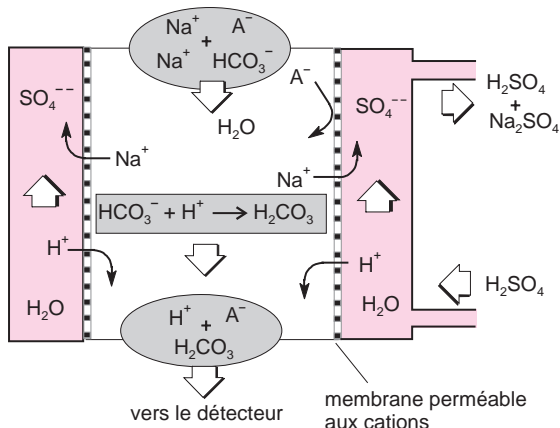
La séparation et le dosage des mélanges d'acides aminés correspondent à une application classique de la chromatographie ionique couplée à une méthode colorimétrique. Les acides aminés ne pouvant être identifiés directement par absorption UV, on les fait réagir en sortie de colonne sur la ninhydrine pour faire apparaître, quel que soit l'acide aminé, le même dérivé coloré, aisément détectable par spectrophotométrie.

■ Le dosage des acides aminés apporte beaucoup d'informations particulièrement dans le diagnostic de maladies. Ce sont les éléments constitutifs des protéines du règne vivant. Ils existent également à l'état libre dans les liquides biologiques. Les échantillons de protéines sont hydrolysés au moyen de HCl 6M vers 200 °C. Quant aux liquides biologiques, ils sont déprotéinés par chauffage avec de l'acide sulfosalicylique.

Pour séparer les acides aminés les uns des autres on utilise un appareillage spécialisé qui comporte une colonne cationique (polystyrène sulfoné) équilibrée avec une solution d'hydroxyde de lithium de façon à ce que les groupements acides sulfoniques soient sous forme de sels de lithium (fig. 4.11). L'échantillon à doser étant porté à pH 2, les aminoacides, sous forme cationique, déplacent les ions Li^+ de la phase stationnaire et s'y fixent plus ou moins solidement en fonction de leur degré d'ionisation. L'élution se fait en augmentant progressivement le pH et les concentrations salines de la phase mobile. En sortie de colonne, ils sont mélangés à un réactif contenant de la ninhydrine puis chauffés. Mis à part les acides aminés secondaires (type $R-NH-R'$), qui donnent une coloration jaune (détectée à 440 nm), les acides aminés primaires (type $R-NH_2$) conduisent à la même coloration violette (détectée à 570 nm). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité d'acide aminé présente dans le milieu réactionnel. Dans des conditions déterminées, le rapport d'absorption optique 570 nm/440 nm est caractéristique pour chaque acide aminé. La limite de détectabilité est d'environ 30 picomoles.

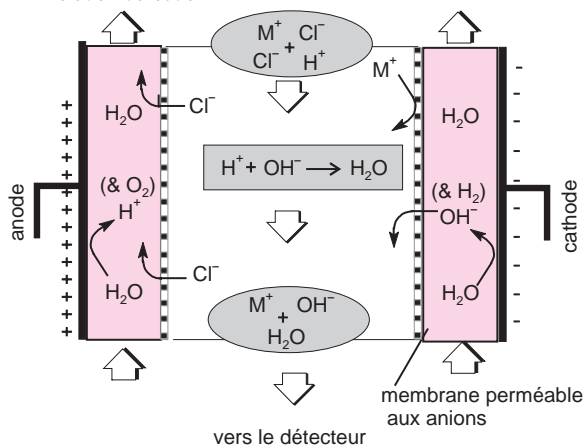
- a) supprimeur à fibre creuse installé en aval d'une colonne séparatrice anionique

élution de l'anion A^-



- b) supprimeur à membrane autorégénérée installé en aval d'une colonne cationique

élution du cation M^+



c)

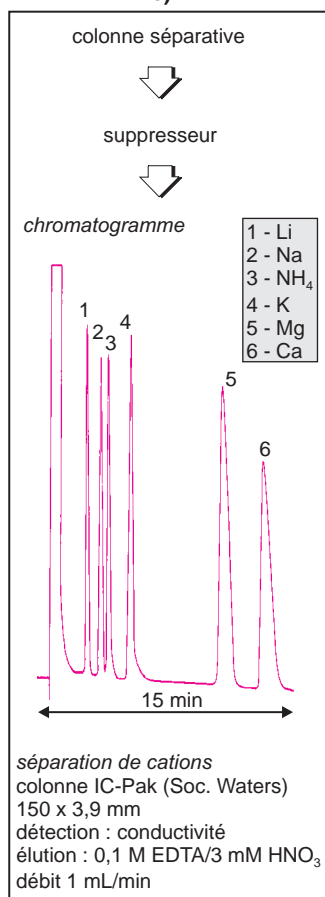


Figure 4.10 Principe de fonctionnement d'un supprimeur à membrane et d'un supprimeur à régénération électrochimique.

Il existe deux types de membranes, les unes perméables aux cations (H^+ et ici Na^+), les autres aux anions (OH^- et ici Cl^-). a) Le modèle à membrane microporeuse cationique est adapté à l'élution des anions. Seuls les cations peuvent traverser la membrane (qui correspond en fait à une paroi polyanionique fixe repoussant, par conséquent, les anions de la solution); b) le modèle à électro-désionisation fait ici appel à un supprimeur à membrane anionique, utilisé, par opposition au modèle précédent, en aval d'une colonne cationique. Il est régénéré en ions par électrolyse de l'eau. Noter, dans les deux cas, la circulation à contre-courant entre la phase éluée et la solution du supprimeur post-colonne; c) exemple d'une séparation de cations inorganiques (concentrations de l'ordre du ppm) utilisant un supprimeur de ce type.

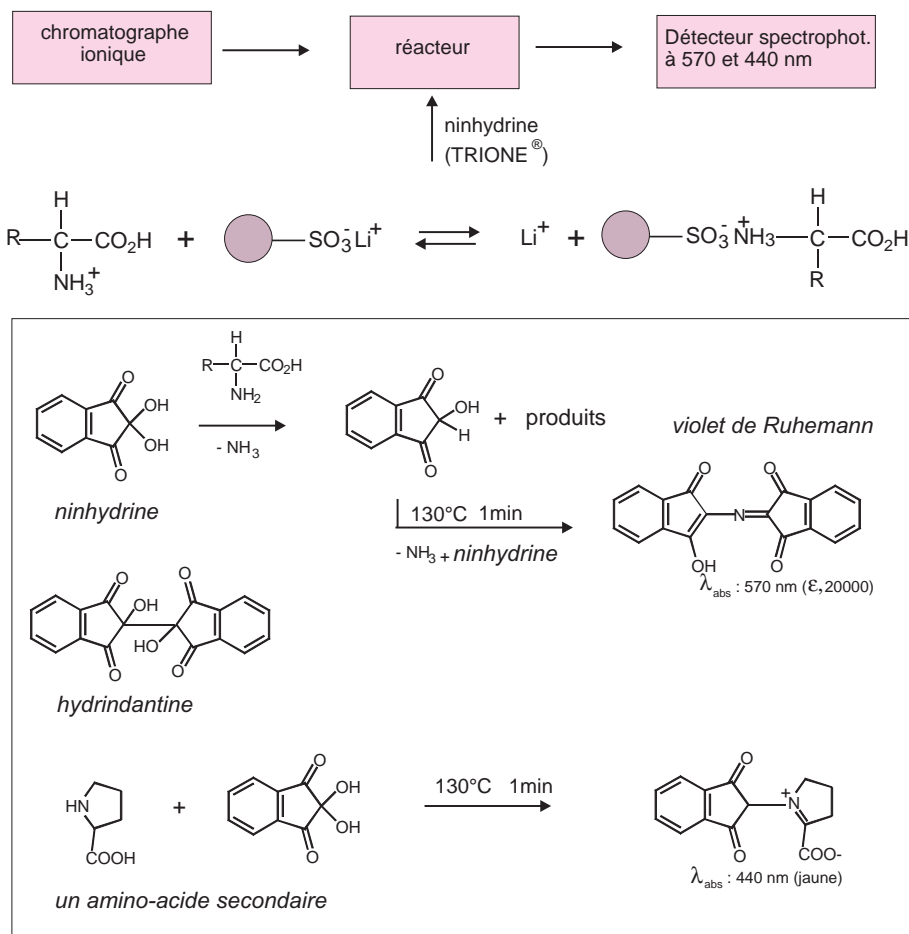


Figure 4.11 Analyse des acides aminés.

Réaction d'échange sur la colonne et réactions de dérivation avec la ninhydrine. Quel que soit l'acide aminé de départ, *R* désignant le reste de la molécule sous forme non-explicite, il se forme le violet de Ruhemann, dont le maximum d'absorption est à 570 nm. L'hydrindantine qui se forme par couplage de 2 molécules de ninhydrine est un catalyseur de la réaction. Une alternative consiste à transformer chaque amino-acide en un dérivé fluorescent de l'indole en présence d'aldéhyde *o*-phthallique et d'un dérivé du thio-éthanol.

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.waters.com
www.dionex.com

www.agilent.com
www.metrohm.com

www.millipore.com
www.shimadzu.com

EXERCICE

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 4.1

Pour séparer un mélange de protéines, on utilise une colonne comportant une phase à base de cellulose carboxyméthylée. Le diamètre interne DI de la colonne est de 0,75 cm et sa longueur 20 cm. Le pH de la phase mobile est ajusté à 4,8. Le débit de la phase mobile est réglé à 1 mL/min. Le volume mort est de 3 mL. On note qu'il apparaît trois pics correspondant aux volumes d'élution V_1 à V_3 de 12, 18 et 34 mL.

- a) S'agit-il d'une phase anionique ou, au contraire, de type cationique ?
- b) Pourquoi en augmentant le pH de la phase mobile, modifie-t-on notablement les temps de rétention de ces trois composés ? Prédire si ces temps vont être augmentés ou diminués.

Chapitre 5

Chromatographie planaire

La chromatographie planaire, également connue sous le nom de chromatographie sur couche mince (CCM), est une technique complémentaire de la CLHP, ayant sa propre spécificité. Bien que la mise en œuvre de ces deux techniques soit différente, le principe de la séparation et la nature des phases restent les mêmes. Méthode sensible, de faible coût, pouvant être automatisée, elle est devenue désormais indispensable sachant aussi qu'il est possible de mener plusieurs séparations en parallèle. L'appareillage actuel permet de maîtriser les trois étapes essentielles : le dépôt de l'échantillon, la migration sur la plaque et la mesure de concentration. Applicateurs et densitomètres automatiques ont ainsi conduit à la nano-CCM, une technique très sensible qui peut être couplée à la spectrométrie de masse.

5.1 MISE EN ŒUVRE DE LA CHROMATOGRAPHIE PLANAIRE

La séparation par chromatographie planaire des constituants de l'échantillon est réalisée sur une fine couche (100 – 200 μm) de phase stationnaire, généralement à base de gel de silice, déposée sur une plaque rectangulaire de verre, de plastique ou d'aluminium, de quelques centimètres de côté. Pour maintenir la phase stationnaire sur le support et assurer la cohésion des particules, un liant organique est incorporé au cours de la fabrication de la plaque.

Le principe de la séparation entre phases est semblable à celui de la CLHP, mais la conduite de l'expérience de CCM est différente. On distingue trois étapes.

5.1.1 Dépôt de l'échantillon

On commence par déposer un petit volume (compris entre quelques nanolitres et plusieurs microlitres) de l'échantillon en solution diluée, à proximité du bord inférieur de la plaque sous forme d'une tache de 1 à 3 mm de diamètre. Ce dépôt est réalisé soit manuellement, soit de manière automatique, avec un capillaire à extrémité plane (fig. 5.1). La tache peut également avoir la forme d'un trait horizontal de quelques mm, obtenu par pulvérisation de l'échantillon au moyen d'un dispositif automatique dont l'intérêt est de pouvoir maîtriser la reproductibilité des quantités déposées, ce qui est indispensable en analyse quantitative. La plaque ainsi préparée est introduite dans une cuve spéciale munie d'un couvercle, au fond de laquelle se trouve un peu de la phase mobile servant d'éluant (fig. 5.2). L'endroit où l'échantillon se trouve doit être situé au-dessus du niveau d'immersion.

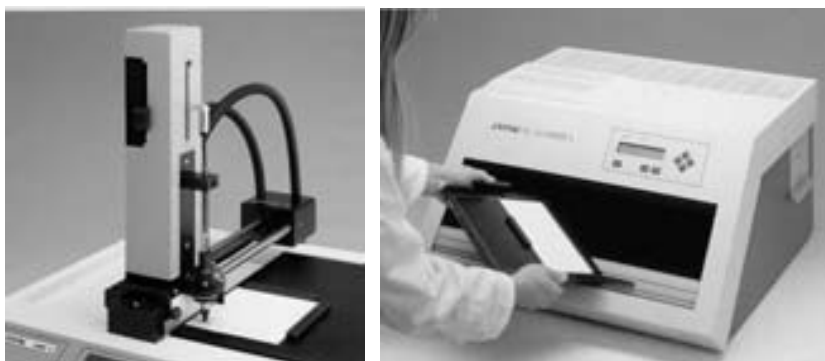


Figure 5.1 Appareil de dépôt automatique en CCM et de lecture de plaque. Applicateur Linomat IV programmable, et densitomètre mesurant la lumière réfléchie ou transmise par la plaque. Le schéma optique est assez semblable à celui d'un spectromètre UV/Visible (modèle Scanner 3, reproduit avec l'autorisation de la société Camag).

5.1.2 Développement de la plaque

La phase mobile migre par capillarité à travers la phase stationnaire sèche, entraînant à des vitesses différentes les constituants à séparer. Le temps de migration (plusieurs minutes) dépend de divers paramètres. Quand le front de solvant a parcouru une distance considérée comme suffisante (quelques centimètres), on retire la plaque de la cuve, on repère la position limite atteinte par la phase mobile et on évapore cette dernière.

Lorsqu'on utilise une plaque à polarité de phase inversée (« *RP*–TLC »), l'éluant comporte de l'eau. Il est alors utile d'ajouter un sel, tel du chlorure de lithium, pour limiter les phénomènes de diffusion et augmenter ainsi la résolution.

5.1.3 Révélation post-chromatographique

La localisation des composés après migration se fait sur la plaque débarrassée de l'éluant.

Les composés qui donnent des taches invisibles doivent être « révélés » (fig. 5.2). À cette fin la phase stationnaire contient un indicateur consistant en un sel de zinc qui émet une fluorescence verte lorsqu'on éclaire la plaque au moyen d'une lampe UV à vapeur de mercure ($\lambda = 254$ nm). Tout composé qui absorbe à cette longueur d'onde apparaît sous forme d'une tache sombre (ou quelquefois colorée) sur un fond illuminé en vert.

Une autre méthode quasi universelle de révélation consiste à carboniser les composés en chauffant la plaque après l'avoir soumise à une pulvérisation d'acide sulfurique. Ce mode d'examen n'est cependant pas utilisable en CCM quantitative : on effectue, dans ce cas, la révélation par immersion dans des réactifs généraux (acide phosphomolybdique, vanilline), ou spécifiques (ninhydrine en solution alcoolique pour les acides aminés, par exemple). Plusieurs centaines de réactifs répertoriés servent à introduire des groupements chromophores ou fluorophores.

- L'utilisation d'une plaque de forme carrée permet de faire de la chromatographie bidimensionnelle en procédant à deux éluations successives avec deux éluants différents (fig. 5.3). Une application typique de cette méthode est la séparation des acides aminés. Pour n spots, la résolution peut atteindre $(n * n)$ composés.

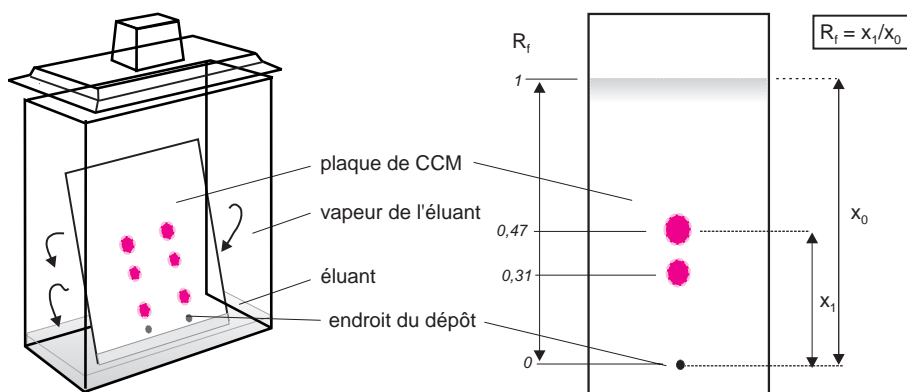


Figure 5.2 Chambre de développement à cuve verticale et plaque de CCM.

De dimensions variées en fonction de la taille des plaques (de 5×5 à 20×20 cm) elles sont en verre et munies d'un couvercle. Aspect classique d'une plaque après révélation des spots de migration, calcul du R_f .

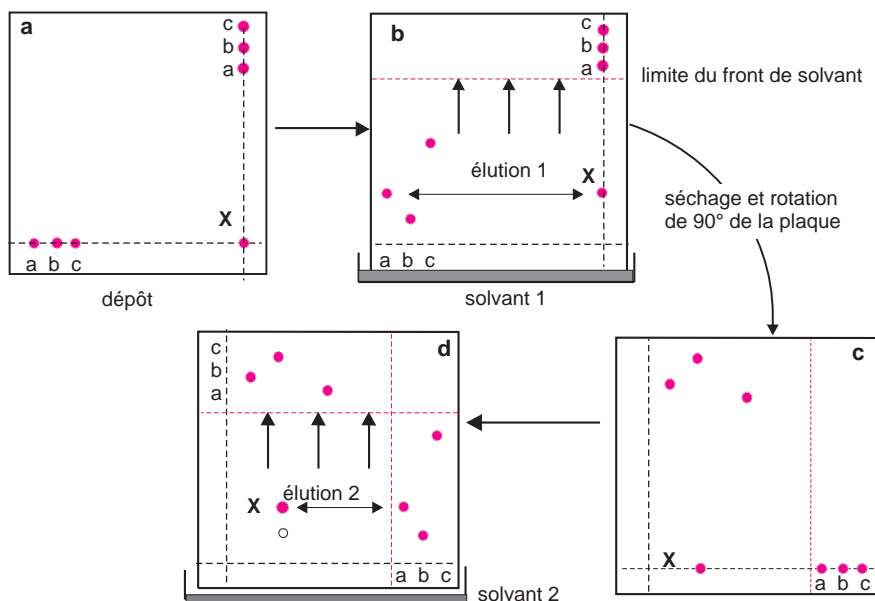


Figure 5.3 Une expérience de CCM bi-dimensionnelle.

En procédant à 2 éluions successives dans les 2 directions, on peut conclure que le composé X est un mélange d'au moins deux composés parmi lesquels le composé de référence a (même R_f dans les deux solvants), mais le second composé n'est pas b, bien qu'ayant le même R_f dans l'éluion 2.

5.2 PARTICULARITÉS LIÉES À LA CCM

La CCM met en jeu des phénomènes physico-chimiques plus complexes que la CLHP ;

- trois phases distinctes sont présentes entre lesquelles des équilibres naissent : la phase stationnaire, la phase mobile liquide et la phase vapeur.

- la phase stationnaire n'est que partiellement en équilibre avec la phase liquide avant le passage des composés. Selon la manière dont on fait la séparation, la phase mobile est en équilibre ou non avec la phase vapeur. Les vitesses de migration en dépendent ;
- le pouvoir d'adsorption de la surface diminue de façon notable dès qu'une partie des sites d'adsorption est occupée, ce qui a pour effet d'étirer les taches en longueur. Le R_f d'un composé à l'état pur ou présent dans un mélange est donc légèrement différent ;
- on ne peut faire varier le débit de la phase mobile, pour améliorer l'efficacité de la séparation. Un remède consiste à faire des développements multiples en séchant la plaque entre chaque cycle de migration ;
- la vitesse de progression du front de solvant n'est pas constante. C'est une fonction complexe où intervient, entre autres, la dimension des particules de la phase stationnaire. Elle obéit à une loi quadratique : $x^2 = k \cdot t$, où x représentant la hauteur du front, t le temps et k une constante (fig. 5.4). Il en résulte que la résolution entre deux spots dépend beaucoup du R_f , donc du composé. Elle atteint généralement son maximum pour un R_f d'environ 0,3.

En résumé, l'efficacité N d'une plaque est très variable. La hauteur équivalente à un plateau théorique passe par une valeur optimale, comme en CLHP.

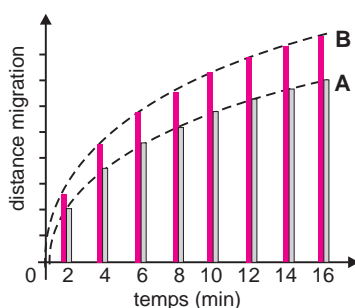


Figure 5.4 Distances de migration de l'éluant sur une plaque de CCM.

En repérant à des intervalles de temps constants la migration de l'éluant, on met en évidence la progression de type quadratique du front de solvant. La courbe A a été obtenue dans une cuve non saturée de la vapeur de l'éluant. La courbe B a été obtenue en saturant la cuve de la vapeur de l'éluant.

5.3 PHASES STATIONNAIRES

Beaucoup de facteurs et de paramètres physico-chimiques sont à prendre en compte dans la recherche d'une bonne phase stationnaire. La taille des grains, leur surface spécifique, le volume des pores, leur diamètre et la répartition granulométrique définissent les propriétés des matériaux utilisés. Pour la nano-CCM, la taille des particules est de l'ordre de 4 μm et celle des pores de 6 nm. Le rapport entre le nombre de groupements silanols et siloxanes fixe le caractère hydrophile plus ou moins prononcé de la phase. Ensuite, comme en CLHP, il existe des silices greffées par des chaînes aux structures variées, attachées par des liaisons covalentes aux fonctions silanols de la surface. Certaines sont constituées de simples

greffons alkyles (*RP*-2, *RP*-8, *RP*-18), d'autres, de greffons comportant des fonctions organiques (nitrile, amine ou alcool), de sorte que certains types de plaques peuvent être utilisés avec n'importe quel système de solvants. La figure 5.5 rassemble, en guise d'exemple, les résultats obtenus dans la séparation d'un mélange test de quatre esters (des parabènes) composés de polarités différentes, chromatographiés sur six phases stationnaires, avec deux phases éluantes binaires, l'une apolaire et l'autre polaire.

On utilise également en CCM des supports à base de cellulose, sous forme de fibre ou de poudre microcristalline, modifiés chimiquement. La plus connue est la DEAE-cellulose, phase assez basique comportant le groupement diéthylaminoéthyle. D'autres phases, aux propriétés d'échange d'ions, ont un caractère hydrophile mis à profit pour la séparation des ampholytes.

■ L'utilisation de liants minéraux (type plâtre) rend la couche de phase stationnaire fragile, ce qui peut être un avantage lorsqu'on veut récupérer les composés séparés en décollant du support les zones utiles et en les extrayant avec un solvant.

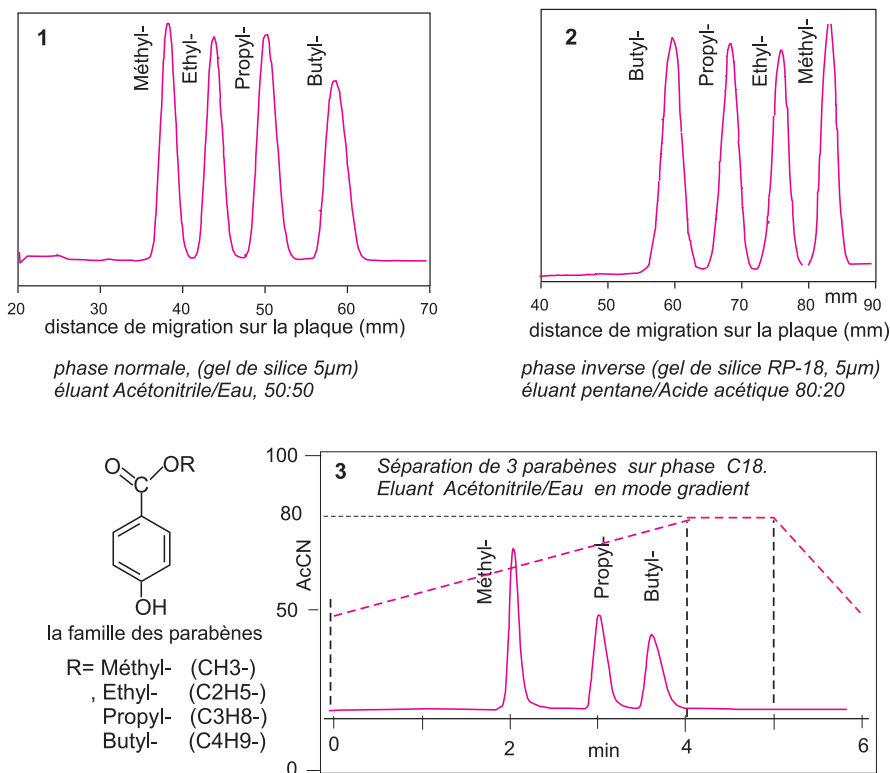


Figure 5.5 Étude de la séparation de composés (famille des parabènes) sur des phases différentes.

(1) Sur phase polaire avec un éluant peu polaire l'ordre de migration (du plus petit déplacement vers le plus grand) correspond à l'ordre de polarité décroissante (le butyl-parabène le moins polaire migre plus vite). En revanche, sur phase inversée peu polaire (2), avec un éluant polaire, l'ordre de migration correspond à l'ordre de polarité croissante. Par comparaison, en CLHP sur phase inverse (3), avec le même type d'éluant, on observe que le butylparabène a le plus grand temps de rétention.

5.4 PARAMÈTRES DE SÉPARATION ET DE RÉTENTION

Chaque composé est défini par son R_f , (abréviation de « *retardation factor* »), qui correspond à sa migration relative par rapport au solvant :

$$R = \frac{\text{distance parcourue par le soluté}}{\text{distance parcourue par le front de solvant}} = \frac{x}{x_0} \quad (5.1)$$

On définit l'efficacité N de la plaque pour un composé dont la distance de migration est x et le diamètre du spot w par la relation 5.2 et H (HEPT) par la relation 5.3 :

$$N = 16 \frac{x^2}{w^2} \quad (5.2)$$

et

$$H = \frac{x}{N} \quad (5.3)$$

Pour calculer le facteur de rétention k d'un composé ou la sélectivité entre deux composés on fait généralement correspondre les distances de migration sur la plaque aux temps de migration lus sur un chromatogramme. En admettant que le rapport des vitesses \bar{u} et \bar{u}_0 de migration sont les mêmes sur la plaque et la colonne (ce qui n'est qu'une approximation), on pourra relier R_f et k :

$$R_f = \frac{x}{x_0} = \frac{\bar{u}}{\bar{u}_0} = \frac{t_0}{t} = \frac{1}{k+1} \quad \text{soit} \quad k = \frac{1}{R_f} - 1 \quad (5.4)$$

Enfin, on pose que la résolution, à l'image de l'expression 1.26, a pour valeur :

$$R = 2 \frac{x_2 - x_1}{w_1 + w_2} \quad (5.5)$$

5.5 CCM QUANTITATIVE

Pour valider une méthode de dosage par CCM il faut non seulement disposer d'un moyen de quantification des taches (figures 5.1 et 5.6), mais aussi définir les paramètres habituels (spécificité, étendue du domaine de linéarité, précision...). Dans ce but, la plaque à examiner est déplacée sous l'optique d'un densitomètre (ou scanner) qui mesure soit l'absorption soit la fluorescence à une ou plusieurs longueurs d'onde. Cet appareil conduit à un pseudochromatogramme comportant des pics dont on peut mesurer les aires (voir par ex. figure 5.5). Il s'agit en fait d'une image isochrone de la séparation à l'instant final. En CCM il suffit de quelques ng d'un composé absorbant dans l'UV pour former une tache décelable.

■ Afin de révéler les composés marqués par un radio-isotope β^- , on dispose de densitomètres particuliers équipés d'une caméra vidéo qui donne une image de la distribution radioactive de la plaque. L'ancien procédé d'autoradiographie par contact sur une plaque photographique a pour défaut d'être très peu sensible (poses pouvant dépasser 48 heures). Ces densitomètres connus sous le nom de machines de Charpak, sont également utilisés en électrophorèse sur gel. La sensibilité est suffisante pour déceler des activités de quelques becquerels par mm².

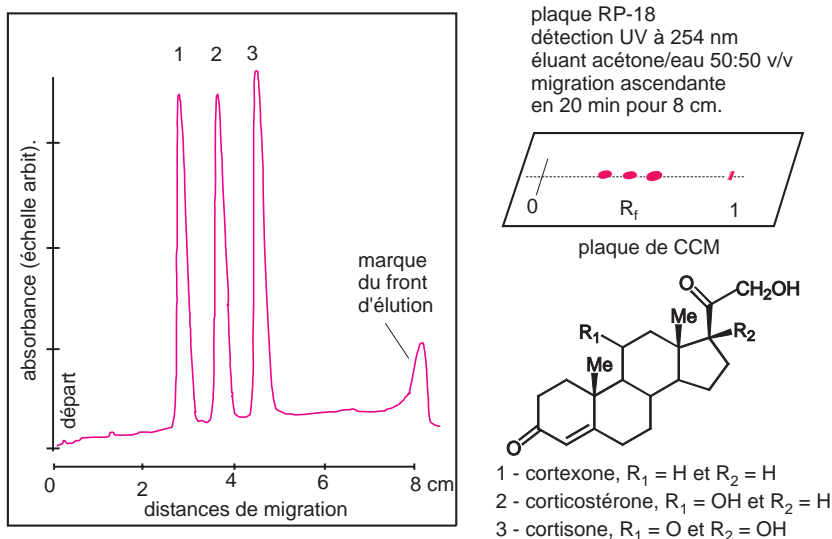


Figure 5.6 Séparation de 3 stéroïdes en CCM sur phase de polarité inversée. La distance de migration augmente avec la polarité du composé. Le *pseudochromatogramme* a été obtenu par scannérisation de la plaque CCM. La même séparation menée en CLHP conduirait à un chromatogramme dans lequel l'ordre des pics serait inversé, un composé fortement retenu ayant un plus grand temps d'élution.

La CCM est bien loin d'être la technique d'appoint qu'elle était à ses débuts. Pour beaucoup d'applications, elle permet d'obtenir des résultats de qualité, comparables à ceux de la CLHP. Bien qu'elle demande encore actuellement plus d'intervention humaine que cette dernière, l'utilisation des nouveaux outils perfectionnés pour déposer, développer en faisant usage de gradients d'élution, révéler et lire la plaque, lui confère la reproductibilité nécessaire. Une récente avancée technologique consiste à faire migrer l'éluant à vitesse constante en exerçant une surpression par un gaz au niveau de la cuve de développement spécialement prévue à cet effet. On gagne en temps et en qualité de séparation.

Comparée à la CLHP, la CCM est apte à traiter plus d'échantillons dans le même temps, par mise en œuvre d'analyses faites en parallèle sur la même plaque. La préparation des échantillons est moins contraignante qu'en CLHP la plaque étant à usage unique, ce qui est très utile principalement pour les échantillons biologiques. La plaque de CCM sur laquelle des produits ont été séparés est aussi un moyen, provisoire, de conserver des très petits échantillons, qui après extraction peuvent servir à d'autres analyses (spectrométrie de masse par exemple).

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.alltech.com
www.camag.com

www.analtech.com
www.macherey-nagel.com

www.bioscan.com
www.whatman.com

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 5.1

Un mélange de deux composés *A* et *B* conduit après migration à deux taches aux caractéristiques suivantes (distance de migration *x* et diamètre du spot *w*) :

- $x_A = 27 \text{ mm}$ $w_A = 2 \text{ mm}$
- $x_B = 33 \text{ mm}$ $w_B = 2,5 \text{ mm}$

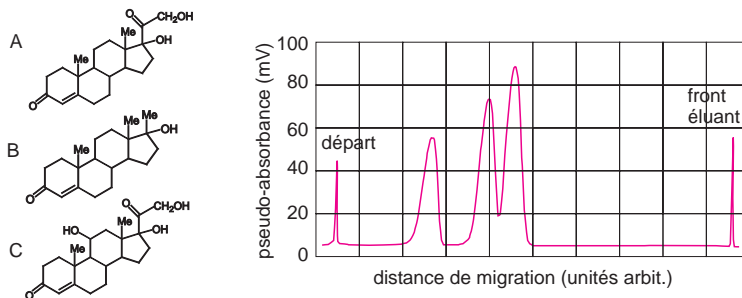
La migration du front de solvant dans cette expérience est de 60 mm.

- a) Calculer R_f , N et H pour chacun des composés.
- b) Calculer le facteur de résolution entre les deux composés *A* et *B*.
- c) Établir la relation entre le facteur de sélectivité et le R_f des deux composés. Calculer sa valeur numérique.

Exercice 5.2

La figure ci-après représente le résultat de la scannérisation d'une plaque de CCM en phase normale (phase mobile : hexane/acétone 80:20). Les trois composés ont pour structures *A*, *B* et *C*.

- a) Attribuer à chaque pic de l'enregistrement le composé qui lui correspond.
- b) Quel serait l'ordre d'élution des composés *A*, *B* et *C* sur une colonne de CLHP contenant le même type de phase stationnaire et la même phase mobile ?
- c) Quel serait l'ordre d'élution des composés *A*, *B* et *C* sur une colonne de CLHP contenant une phase de type *RP*-18 avec comme éluant un mélange acétonitrile/méthanol (8:2) ?
- d) Calculer le R_f du composé qui migre le plus rapidement sur la plaque.
- e) Pour ce même composé, calculer, à partir de l'enregistrement reproduit, l'efficacité de la plaque CCM et la HEPT correspondante (on utilisera pour ce calcul la formule transposée de la chromatographie sur colonne donnant l'efficacité en fonction de δ largeur du pic à mi-hauteur, avec *x*, distance de migration).



Chapitre 6

Chromatographie en phase supercritique

La chromatographie en phase supercritique (SFC) a pour originalité d'utiliser comme phase mobile un fluide à l'état supercritique, ce qui améliore les séparations de composés thermolabiles ou de masses moléculaires élevées. Le matériel est de conception hybride entre CPG et CLHP. On peut utiliser soit les colonnes capillaires de la CPG soit les colonnes classiques de la CLHP, mais la tendance actuelle est d'opter plutôt vers l'utilisation de ces dernières. L'arrivée tardive de cette technique sur le marché de l'instrumentation a été un handicap à son développement, beaucoup de méthodes étant déjà normalisées avec les autres techniques chromatographiques classiques qui donnent satisfaction. Si on ajoute à cet argument que le matériel est plus complexe et d'un coût plus élevé, on conçoit que peu de constructeurs d'instruments d'analyse s'y soient intéressés et que ce type de chromatographie soit resté peu développé.

6.1 RAPPEL SUR LES FLUIDES SUPERCRITIQUES

Le passage d'un corps pur de l'état liquide à l'état gazeux, et réciproquement, correspond à un changement de phase qu'il est possible de provoquer en agissant sur la température ou la pression, mais seulement dans un domaine limité. En particulier, au-dessus d'une température appelée température critique T_C , un corps pur à l'état gazeux ne peut passer à l'état liquide, quelle que soit la pression qu'on lui applique. La pression minimum requise pour liquéfier un gaz à sa température critique est appelée pression critique P_C . La courbe délimitant les domaines gazeux et liquide s'arrête au point critique C (fig. 6.1). Les phases gazeuse et liquide ont alors même densité. Au-delà le corps pur considéré devient un fluide supercritique.

L'utilisation de fluides supercritiques comme phases mobiles en chromatographie présente certains avantages liés à leurs propriétés physiques intermédiaires entre celles des liquides et des gaz. En particulier leur viscosité est de 10 à 20 fois plus faible que celle des phases liquides habituelles. D'autre part les propriétés de solvation (repérées par les coefficients de distribution K) sont du même ordre que celles des solvants organiques peu polaires. Ainsi le dioxyde de carbone sous 300 bars et 40 °C peut-il être comparé au benzène pour les applications chromatographiques.

Suivant le choix de la température et de la pression, le comportement d'un fluide supercritique ressemble tantôt à celui d'un gaz dense, tantôt à celui d'un liquide (fig. 6.1).

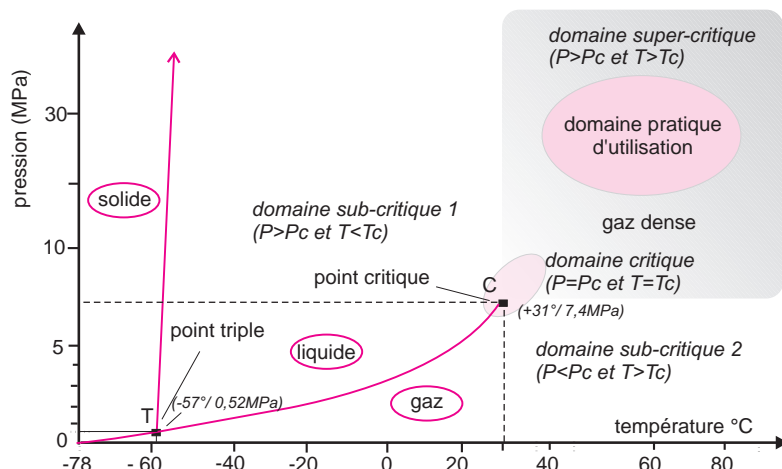


Figure 6.1 Diagramme d'équilibre de phase pression/température du dioxyde de carbone

Il existe pour chaque corps pur une relation entre les trois variables pression P , volume V et température T connue sous le nom d'équation d'état. Le diagramme ci-dessus est la projection (P/T) pour CO_2 . Le point critique est situé à 31°C et $7,4\text{ MPa}$ ($1\text{ MPa} = 10^6\text{ Pa}$, soit 10 bars). Il est possible de passer de l'état liquide à l'état gazeux en contournant le point critique, donc sans discontinuité de phase.

■ Le dioxyde de carbone à l'état de phase supercritique permet l'extraction, à l'échelle du laboratoire, de certains échantillons, ce qui permet de séparer de la matrice les analytes qui sont peu stables. Il a également beaucoup d'applications possibles dans l'industrie qui vont des extractions de produits alimentaires (décaféination, récupération d'arômes et d'épices, élimination de graisses) jusqu'au pressing pour le nettoyage à sec des vêtements. Ce fluide particulier peut être éliminé à basse température sans laisser de résidu toxique, mais l'emploi de pressions élevées alliées à de grands volumes rend ces installations d'extraction potentiellement dangereuses.

6.2 LES PHASES SUPERCRITIQUES COMME PHASE MOBILE

Le dioxyde de carbone à l'état supercritique est le composé le plus utilisé parce que son point critique a pour coordonnées $T_C = 31^\circ\text{C}$ et $P_C = 7\,400\text{ kPa}$ (fig. 6.1). Si la pression et la température sont toutes deux supérieures, on passe dans le domaine de l'état supercritique, dans des conditions qui techniquement sont assez faciles d'accès. De plus ce composé est peu toxique, ininflammable, sans odeur et non corrosif.

On utilise également, quoique plus rarement, le monoxyde de diazote

$$\text{N}_2\text{O}, T_C = 36^\circ\text{C}, P_C = 7\,100\text{ kPa},$$

ou l'ammoniac

$$\text{NH}_3, T_C = 132^\circ\text{C}, P_C = 11\,500\text{ kPa}.$$

La densité et par suite le pouvoir de solvation des fluides supercritiques varient avec la pression à laquelle ils sont soumis. Par conséquent, en faisant un gradient de pression en SFC, l'effet est comparable à un gradient de concentration en CLHP, ou à un gradient de température en CPG. Si le chromatographe utilisé permet de réaliser un double gradient de température et de pression, allié à l'ajout d'un modifiant (qui déplace les coordonnées du point critique), il devient possible d'agir de manière très fine sur les facteurs de rétention des analytes, donc sur les sélectivités α (fig. 6.2).

■ À 16 000 kPa et 60 °C, le dioxyde de carbone a une masse volumique de 0,7 g/mL (fig. 6.2), d'où l'expression de « gaz dense », pour exprimer le fait qu'il ne s'agit plus d'un gaz classique. Sa polarité est alors proche de celle du toluène. Par suite de cette faible polarité, on lui ajoute assez souvent un modifiant polaire appelé entraîneur, tel le méthanol, l'acide formique ou l'acétonitrile.

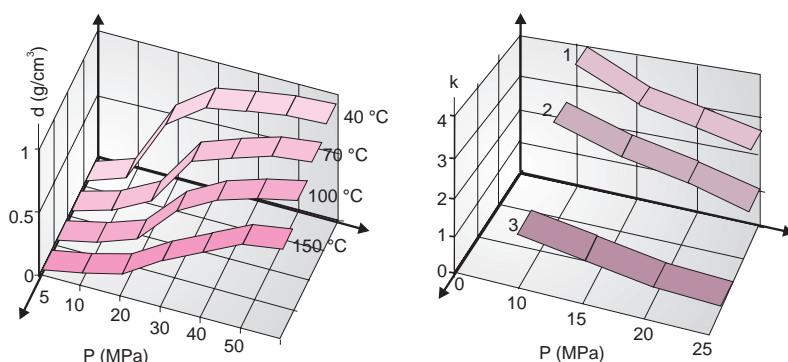


Figure 6.2 Densité du dioxyde de carbone en fonction de la pression pour quatre températures différentes.

Au point critique, la densité de CO_2 est de $0,46 \text{ g/cm}^3$. À droite, variation du facteur de rétention k pour trois alcaloïdes, dans des conditions identiques, excepté la pression fixée en aval de la colonne par le restricteur ($T = 40 \text{ °C}$, modifiant 5 % eau et 15 % méthanol ; 1 : codéine, 2 : thébaïne et 3 : papavérine). Plus la pression augmente, plus k diminue.

6.3 INSTRUMENTATION EN SFC

Les installations de chromatographie en phase supercritique (SFC pour *Supercritical Fluid Chromatography*) sont des montages hybrides de CPG et de CLHP (fig. 6.3 et 6.7). Pour assurer le débit du fluide supercritique on utilise une pompe à seringue ou une pompe à piston dont le corps de pompe est maintenu au-dessous de la température critique à l'aide d'un cryostat réglé vers 0 °C . Dans le cas où un modifiant est ajouté, on utilise soit une seconde pompe, soit une pompe tandem comportant deux chambres, l'une pour le fluide supercritique et l'autre pour le modifiant. Le liquide passe ensuite dans un serpentin chauffé pour élever sa température au-dessus du point critique afin de le transformer en fluide supercritique.

Un appareillage de SFC comporte également un système de contre-pression régulateur pour maintenir la phase mobile à l'état supercritique depuis la pompe jusqu'à l'extrémité de

la colonne, voire jusqu'en aval du détecteur selon le type choisi. Le dispositif de restriction de pression doit gérer correctement le refroidissement important et l'expansion de volume quand la phase supercritique redevient un gaz à la pression atmosphérique. Il est installé en amont du détecteur s'il s'agit d'un FID (ce détecteur à ionisation de flamme fonctionne à la pression atmosphérique), et après pour un détecteur reposant sur l'absorption *UV*, la fluorescence ou la diffusion de la lumière (cf. fig. 7.4).

On utilise une grande variété de colonnes CLHP (remplies) ou CPG (capillaires). Dans ce dernier cas leur longueur varie de 2 à 20 m et le diamètre interne de l'ordre de 50 μm . Le film de phase stationnaire a une épaisseur qui est au minimum de 1 μm . Ces deux types de colonnes sont complémentaires. Leur choix dépend de l'objectif visé. Dans une colonne remplie de type CLHP, le débit important de fluide rendra plus difficile la détection au moyen d'un FID ou mettant en œuvre un couplage avec un spectromètre de masse. Il en sera de même si on a ajouté un modifiant au fluide supercritique.

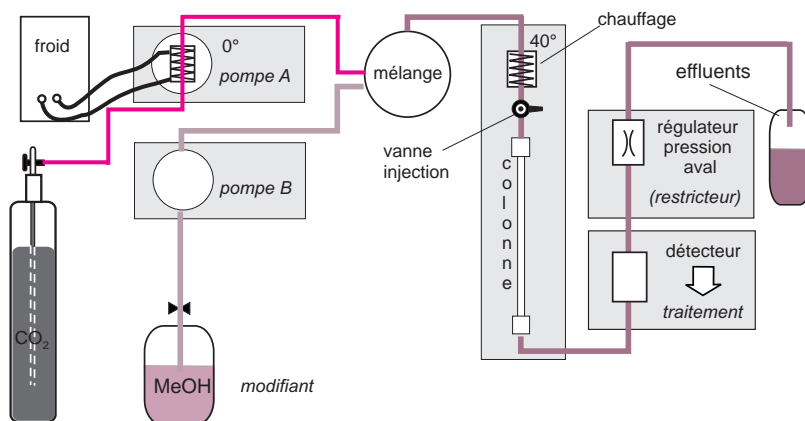


Figure 6.3 Schéma fonctionnel d'une installation de SFC pour colonne remplie de type CLHP.

Le dioxyde de carbone passe à l'état supercritique entre la pompe et l'injecteur. Un régulateur de pression (encore appelé *restricteur*) situé en aval de la colonne, avant ou après le détecteur suivant son type, permet le maintien de la phase mobile à l'état supercritique jusqu'à l'extrémité de la colonne. Un modifiant ajouté en faible quantité (moins de 10 %) permet de gouverner la sélectivité des analytes (dessin exécuté d'après un document de la société Vydac).

6.4 COMPARAISON DE LA SFC AVEC LA CLHP ET LA CPG

La SFC complète les autres techniques classiques de chromatographie liquide ou gazeuse. La migration du soluté résulte d'un mécanisme de partage entre une phase stationnaire apolaire et une phase éluante peu polaire. Le phénomène de rétention est donc différent de celui de la CLHP. Le pouvoir solvant de la phase mobile est déterminé par la pression et la température de la phase supercritique. La résistance au transfert de masse entre la phase stationnaire et la phase mobile est moindre qu'en CLHP parce que la diffusion est plus rapide. Le coefficient *C* de l'équation de Van Deemter étant plus faible, la vitesse de la phase mobile peut donc être plus grande sans perte appréciable d'efficacité (fig. 6.4).

Par ailleurs, comme la viscosité de la phase mobile est proche de celle d'un gaz, on peut utiliser les colonnes capillaires de la CPG. Cependant la perte de charge due à la colonne, modifie les coefficients de distribution des composés entre le début et la fin de leur migration, ce qui provoque un élargissement des pics. De ce fait on n'atteint pas les efficacités rencontrées en CPG.

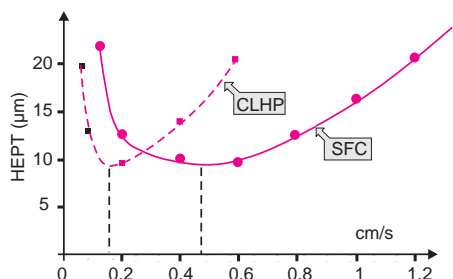


Figure 6.4 Comparaison entre CLHP et SFC. Ces deux courbes expérimentales ont été obtenues avec une même colonne et un même composé, l'une en utilisant une phase liquide classique et l'autre du dioxyde de carbone à l'état supercritique. Les HEPT sont comparables mais la séparation peut être conduite 3 fois plus rapidement en SFC, d'où un gain de temps.

6.5 PLACE DE LA SFC EN CHROMATOGRAPHIE

Les applications de la SFC sont potentiellement nombreuses (fig. 6.5 et 6.6). La possibilité de faire varier la sélectivité par programmation des paramètres P et T au lieu de modifier la composition chimique de l'éluant marque sa différence. La faible viscosité de la phase mobile permet aussi de mettre en série plusieurs colonnes de CLHP. On peut étudier des composés de masses moléculaires plus élevées qu'en CPG (> 1000), avec une résolution meilleure qu'en CLHP. Le domaine propre de la SFC concerne l'analyse des lipides et matières grasses, des émulsifiants, des oligomères et polymères (fig. 6.6). Les séparations étant rapides, la technique se prête à l'installation sur site. L'utilisation du dioxyde de carbone comme phase mobile facilite des modes de détection plus élaborés : couplage avec un spectromètre de masse, un spectrophotomètre infrarouge et même un spectromètre de RMN.

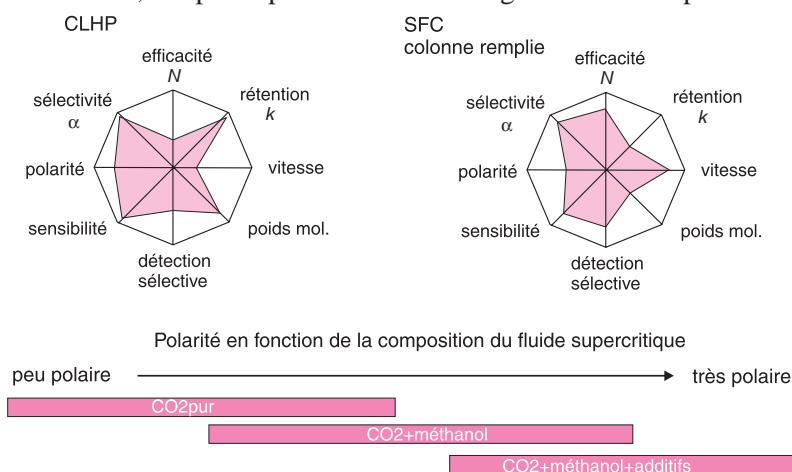


Figure 6.5 Comparaison de la SFC avec colonnes remplies avec la CLHP. Le dioxyde de carbone permet en mélange avec méthanol et additifs de recouvrir la gamme de polarité des principaux types d'analytes.

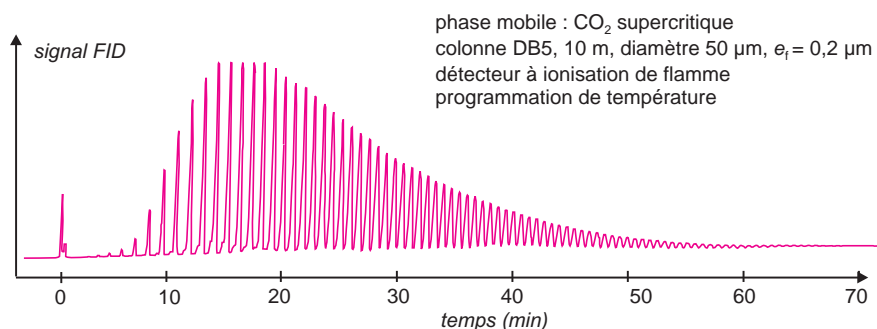
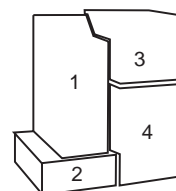


Figure 6.6 Chromatogramme spectaculaire d'un mélange d'oligomères de polysiloxanes en SFC (reproduit avec l'autorisation de la société FISIONS Instruments). Chaque composé défini conduit à un pic unique sur le chromatogramme, permettant ainsi de déterminer la répartition des molécules formées dans une réaction de polymérisation



- 1 - four pour colonne
- 2 - détecteur UV
- 3 - porte échantillons/
injecteur
- 4 - pompe réfrigérée

Figure 6.7 Une installation de SFC commerciale.

Le four où est la colonne permet aussi le préchauffage de la phase mobile. Le corps de pompe est refroidi vers 0 °C (reproduit avec l'autorisation de la société Berger).

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.bergersfc.com
www.isco.com

www.gilson.com
www.selerity.com

www.vydac.com
www.mt.com

Chapitre 7

Chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) permet de séparer les molécules suivant leur taille. Elle utilise pour cela des phases stationnaires qui comportent des pores dans lesquels les composés vont pouvoir diffuser, plus ou moins suivant leur volume. La vitesse de migration d'un composé va donc dépendre, pour une même famille de molécules, de sa masse moléculaire. Bien que l'efficacité des séparations n'atteigne pas celle que l'on observe habituellement en CLHP, la CES est devenue irremplaçable aussi bien dans le domaine de la séparation des macromolécules naturelles que dans l'étude de la répartition en masses des polymères de synthèse. L'efficacité des séparations n'atteint cependant pas celle de la CLHP : la différenciation des composés par leur taille n'est pas le procédé le mieux adapté aux molécules petites ou moyennes. En revanche, elle s'avère très utile pour beaucoup de produits industriels qui sont des mélanges de substances de masses très différentes. L'instrumentation est comparable à celle utilisée en CLHP.

7.1 PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE (CES)

La chromatographie d'exclusion stérique (CES) est basée sur la différence de pénétration des molécules de l'échantillon dans la phase stationnaire (fig. 7.1). La séparation résulte de l'existence de pores dans la phase stationnaire, dont le diamètre est comparable à celui des espèces présentes lorsqu'elles sont *en solution dans la phase mobile*. On désigne la CES par *filtration sur gel* quand la phase stationnaire est hydrophile (phase mobile aqueuse) et par *perméation de gel* quand elle est hydrophobe (la phase mobile est un solvant organique).

Le volume total V_M de phase mobile dans la colonne peut être décomposé en deux parties : le volume interstitiel V_I (extérieur aux pores) et le volume V_P qui est celui des pores. V_I représente le volume de phase mobile nécessaire pour transporter, d'une extrémité à l'autre de la colonne, une grosse molécule supposée exclue des pores et $V_M = V_I + V_P$, le volume correspondant pour une petite molécule pouvant rentrer dans tous les pores. Les volumes d'élution V_e sont donc compris entre V_I et V_M . On a :

$$V_e = V_I + K V_P \quad (7.1)$$

soit

$$K = \frac{V_e - V_I}{V_M - V_I} \quad (7.2)$$

K , coefficient de diffusion, représente le degré de pénétration d'une espèce dissoute dans le volume V_P ($0 < K < 1$). Pour la plupart des remplissages modernes, V_I et V_P sont tous les deux de l'ordre de 40 % du volume de la colonne vide.

■ Lorsque V_e/V_M dépasse 1, le comportement du composé dans la colonne ne suit plus seulement le mécanisme d'exclusion stérique, mais il s'y ajoute des interactions physico-chimiques avec le support comme en CLHP.

Le raisonnement ci-dessus est vérifié dans la pratique : les molécules dont le diamètre est plus grand que celui des plus larges pores ($K = 0$) sont exclues de la phase stationnaire (d'où vient l'expression d'*exclusion stérique*). Elles traversent la colonne sans être retenues et forment un seul pic sur le chromatogramme à la position V_I (fig. 7.1). Par contre le volume d'élution des très petites molécules est V_M . Chaque phase stationnaire est donc adaptée à une plage de séparation exprimée sous forme de deux masses, supérieure et inférieure, au-dessus et au-dessous desquelles il n'y a pas d'effet de séparation possible. Pour augmenter cette plage, qui correspond à la différence entre ces deux volumes, on peut mettre bout à bout 2 ou 3 colonnes.

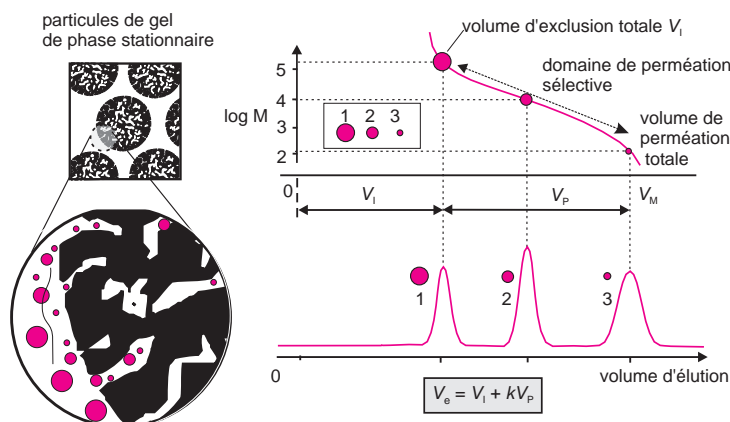


Figure 7.1 Migration au travers du gel de phase stationnaire.

Chromatogramme figurant une séparation de trois espèces (1,2,3) de tailles différentes en solution. Les molécules les plus grosses **1** arrivent en tête, suivies des molécules moyennes **2** et enfin des petites molécules **3**. Les volumes d'élution sont compris entre V_I et $V_M = V_P + V_I$. Image d'un gel poreux pour illustrer la notion de séparation selon la taille des pores.

L'efficacité est optimale avec les solvants de faible viscosité et lorsque les séparations sont effectuées à chaud. Les coefficients de diffusion K sont indépendants de la température.

7.2 PHASES STATIONNAIRES ET PHASES MOBILES

Les phases stationnaires sont constituées par des polymères réticulés organiques ou minéraux (silices greffées de substituants hydroxylés), qui se présentent sous forme de grains sphériques de 3 à 10 μm de diamètre avec des pores compris entre 4 nm et 200 nm. Ces matériaux, communément appelés *gels*, doivent résister à l'effet d'écrasement dû à la pression en tête de colonne et à une température de plus de 100 °C pour la technologie actuelle.

■ La réduction du diamètre des particules, gage d'efficacité, a pour effet de diminuer les passages interstitiels ce qui rend plus difficile la migration des grosses molécules exclues. Aussi est-il préférable dans ce cas d'augmenter la taille des particules et de compenser par une colonne plus longue. Les colonnes standards ont une longueur de 30 cm (diamètre interne de 7,5 mm). Leur efficacité N peut atteindre 10^5 plateaux/m.

La nature des phases en présence dépend du type de CES :

- pour la **perméation de gel** (GPC) la phase stationnaire la plus courante est un polymère *styrène-divinylbenzène* et la phase mobile un solvant organique (fig. 7.2). Le tétrahydrofurane, le benzène, le trichlorométhane ainsi que le trichlorobenzène (réservé aux polymères de synthèse difficiles à solubiliser) sont utilisés.

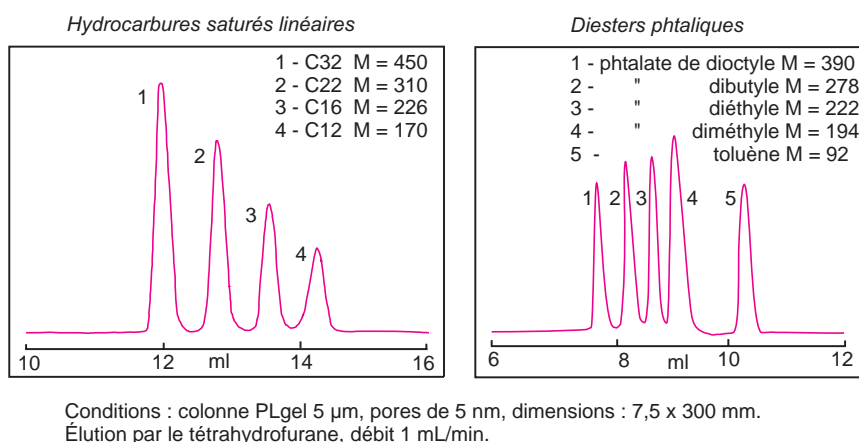


Figure 7.2 Perméation de gel.

Lorsque la phase stationnaire possède des petits pores, on peut séparer des composés organiques de faible masse moléculaire. Le toluène, dans le chromatogramme de droite (plastifiants de polymères), permet de repérer V_M (reproduit avec l'autorisation de la société Polymer Laboratories).

- pour la **filtration sur gel** on utilise des phases stationnaires polyhydroxylées à base d'*alcools polyvinyliques* purs ou copolymérisés avec des *polyglycérométhacrylates*, ou bien des *polyacétates de vinyle* (fig. 7.3). Ces phases portent le nom de gels car elles gonflent en présence des phases mobiles aqueuses. On fait également appel à des gels de silice poreuse dont la surface est hydrophile (présence du groupement glycéropropyle [$\equiv\text{Si}(\text{CH}_2)_3\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$])). Les phénomènes d'adsorption sont faibles, même pour les petites molécules. Elles servent pour séparer les bio-polymères (ex. polysaccharides) ou les macromolécules biologiques (les protéines par exemple), qui exigent une phase mobile aqueuse.

■ Le terme de filtration sur gel ne doit pas être confondu avec le procédé courant de filtration qui produirait plutôt l'effet inverse, à savoir que les plus grosses molécules auraient plus de mal à traverser le filtre que les petites.

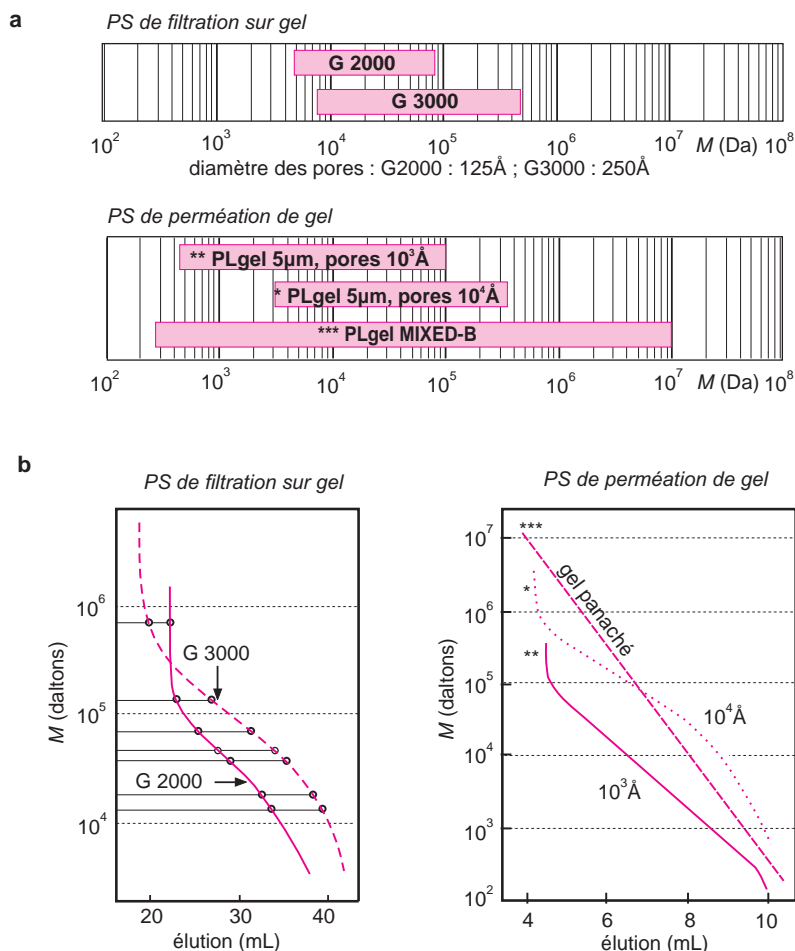


Figure 7.3 Comparaison de colonnes de filtration sur gel et de perméation de gel et caractéristiques de phases stationnaires.

a) Graphe indiquant le domaine de masse de 2 phases en filtration sur gel et de 3 phases en perméation de gel ; b) courbes d'étalonnage ($\log M = f(V)$) de ces différentes phases, obtenues avec des protéines connues pour les colonnes de filtration sur gel et des standards de polystyrène pour les autres. Une pente faible de la partie linéaire témoigne d'une meilleure résolution entre masses voisines. C'est le cas lorsque les pores ont une dimension régulière. Les courbes $\log M = f(K)$ tracées moins fréquemment ont même aspect (reproduit avec l'autorisation des sociétés Tosohaas et Polymer Lab.). Pour les protéines on ajoute quelquefois des dénaturants afin de détruire d'éventuels agrégats en phase aqueuse.

7.3 TRAITEMENT DU CHROMATOGRAMME

Chaque phase stationnaire est décrite pour un solvant donné par une courbe d'étalonnage établie à partir de macromolécules ou de polymères monodispersés de masses M connues et de même structure que l'échantillon : polystyrènes, polyoxyéthylènes, pullulanes ou polyéthylèneglycols... (fig. 7.3 et tableau 7.1). Les courbes représentant $\log M$ en fonction du

volume d'élution ont une allure sigmoïdale, mais en faisant des mélanges de phases stationnaires de porosités différentes, on obtient des colonnes mixtes donnant une réponse pratiquement linéaire sur une large plage de masses. Ces courbes restent néanmoins assez indicatives dans la mesure où tailles et masses ne sont pas des paramètres étroitement liés lorsqu'on passe d'un polymère à un autre.

Tableau 7.1 Domaine de perméation (Da) de trois hydrogels en fonction des standards choisis.

Étalon	G2000 pores 12,5 nm	G3000 pores 25 nm	G4000 pores 45 nm
Protéine globulaire	5 000 - 100 000	10 000 - 500 000	20 000 - 7 000 000
Dextrane	1 000 - 30 000	2 000 - 70 000	4 000 - 500 000
Polyéthylèneglycol	500 - 15 000	1 000 - 35 000	2 000 - 250 000

7.4 INSTRUMENTATION

Le matériel est comparable à celui qui est employé en CLHP si ce n'est que les colonnes ont des volumes plus importants. Pour améliorer la résolution il est assez courant de mettre en série deux ou trois colonnes aux porosités complémentaires.

Le détecteur le plus employé est le réfractomètre différentiel. Pour les polymères, la variation d'indice de réfraction étant généralement indépendante de la masse moléculaire, ce détecteur est considéré comme universel. D'autres détecteurs sont parfois ajoutés au réfractomètre. Ils sont basés sur l'absorption lumineuse (détecteur UV) la diffusion de la lumière (fig. 7.4) et la viscosimétrie. Ils donnent des indications complémentaires sur les composés séparés.

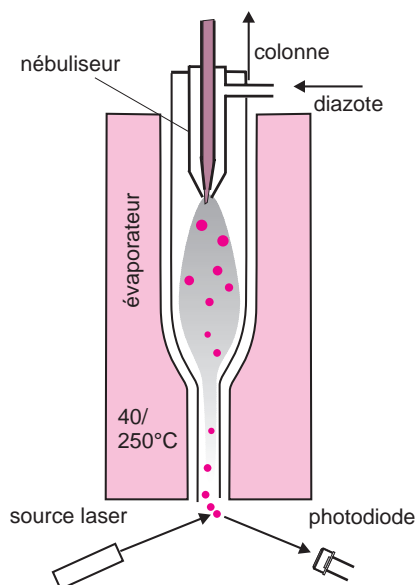


Figure 7.4 Détecteur à diffusion de la lumière.

La phase mobile en sortie de colonne est transformée, sous l'effet d'un courant de diazote, en un brouillard par un dispositif d'atomisation de géométrie adaptée. Lorsqu'un composé est élué, les gouttelettes, en s'évaporant, abandonnent en suspension de fines particules. Éclairées par une source laser elles diffusent la lumière par effet Tyndall (ce qui se passe est comparable à la diffusion de la lumière que l'on observe avec les phares d'une voiture par temps de brouillard). Le signal émis par la photodiode est en rapport avec la concentration du composé ainsi éclairé. Les facteurs de réponses sont très voisins quel que soit le composé. Ce détecteur n'est évidemment pas utilisable pour les composés volatils à la température de la zone chauffée.

7.5 DOMAINES D'APPLICATION

Comme il est possible de séparer des masses nominales allant de 200 à plus de 10^7 Da, les principales applications se trouvent dans le domaine de l'analyse des polymères, qu'ils soient d'origine naturelle ou de synthèse. L'absence d'interaction chimique avec la phase stationnaire, associée à une élution rapide et la récupération totale des analytes, constituent autant d'avantages. La mise au point des analyses est rapide, sachant aussi qu'on n'utilise pas de gradient d'élution puisqu'il n'y a pas d'interaction soluté/phase mobile.

Le choix de la phase stationnaire adaptée à la séparation envisagée se fait à partir des courbes d'étalonnage des différentes colonnes disponibles. On retient celle dont la courbe en masses présente une partie linéaire de faible pente recouvrant toute l'étendue des masses présentes dans l'échantillon (fig. 7.5). Il faut que l'étalonnage soit réalisé avec des standards de même type, les macromolécules pouvant adopter des formes variées allant de la pelote à l'aspect filiforme. Ainsi le tableau 7.1 montre que les domaines de séparation des 3 gels de la figure 7.3 sont différents suivant les standards utilisés.

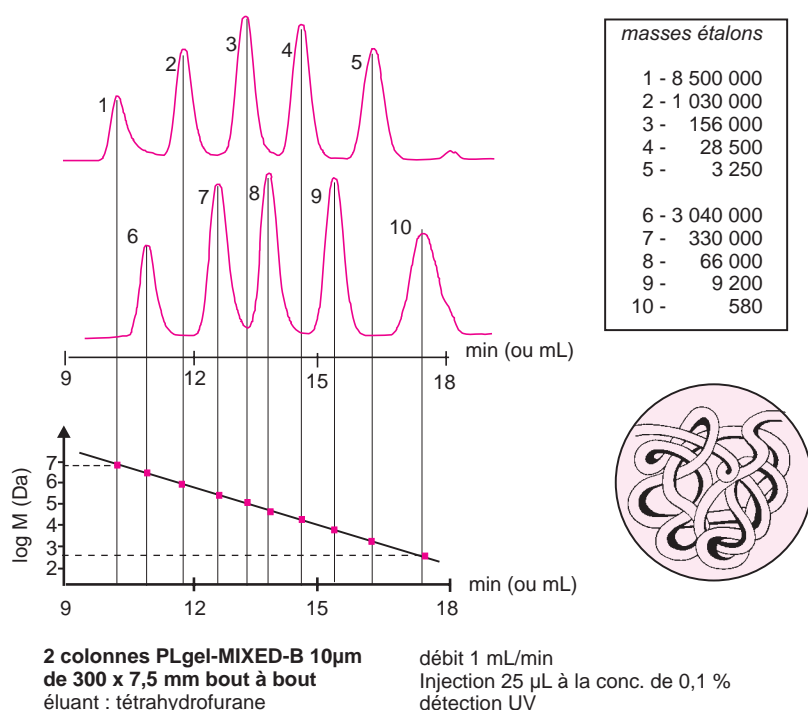


Figure 7.5 Courbe d'étalonnage d'aspect linéaire d'une colonne de perméation de gel.

En utilisant, comme le montre la figure, deux mélanges complémentaires d'étalons de polystyrène on dispose d'un nombre suffisant de masses pour étalonner la colonne. La droite obtenue, qui recouvre un large domaine de masses (conséquence d'une phase stationnaire « panachée »), permet, dans un second temps de déterminer la masse moléculaire d'un polystyrène inconnu. En bas, à droite, le dessin symbolise une macromolécule repliée sur elle-même par effet du solvant. On désigne ce volume par *volume hydrodynamique* de la macromolécule.

7.5.1 Distribution des masses moléculaires d'un polymère

Un polymère, même chimiquement pur, correspond toujours à un mélange de répartition de macromolécules de masses différentes. C'est une application classique de la chromatographie d'exclusion que de déterminer pour ce type d'échantillons la distribution moléculaire, de caractériser la masse la plus probable et la masse moyenne. Il faut que l'étalonnage de la colonne puis l'analyse proprement dite soient réalisées avec le même débit de phase mobile.

7.5.2 Analyses diverses

La technique est utile pour analyser les échantillons de composition inconnue, susceptibles de contenir à la fois des polymères et des petites molécules, ce qui est le cas de nombreux produits commerciaux ou industriels, tels les produits de biodégradation des polymères.

Pour les composés organiques courants qui peuvent être analysés par CLHP ou CPG il y a moins d'applications, sauf pour les sucres et polysaccharides (fig. 7.6) tels l'amidon, la pâte à papier, les boissons et certains produits pharmaceutiques.

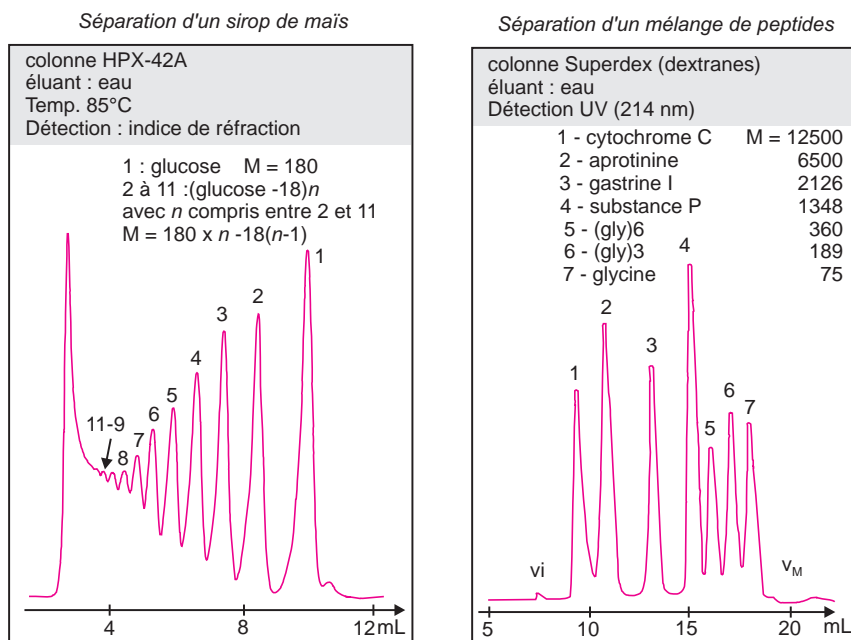


Figure 7.6 Chromatogrammes de filtration sur gel.

À gauche, séparation d'un mélange d'oligomères du glucose allant du premier terme (le glucose, $M = 180$), jusqu'à une vingtaine d'unités (M environ 3 000) (reproduit avec l'autorisation de Polymer Lab.). À droite, séparation d'un mélange de diverses protéines et oligomères de la glycine (reproduit avec l'autorisation de Pharmacia-Biotech).

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.alltech.com

www.richardscientific.com

www.shimadzu.com

www.polymerlabs.com

www.jascoinc.com

www.dionex.com

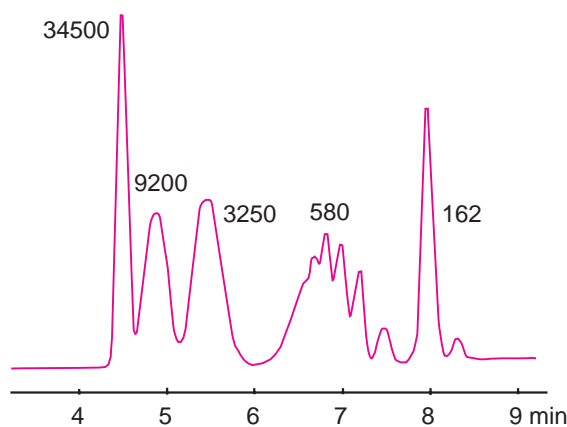
EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 7.1

On chromatographie une solution dans le tétrahydrofurane (THF) d'un mélange de polystyrènes de masses moléculaires connues sur une colonne (DI = 7,5 mm, $L = 300$ mm) dont le domaine de perméation s'étend de 400 à 30 000 daltons. La phase éluante est du THF. Son débit est de 1 mL/min. La détection UV est effectuée à 254 nm.

À partir du chromatogramme obtenu reproduit ci-après :



a) Calculer le volume d'exclusion totale (volume interstitiel) et le volume des pores de la colonne utilisée.

b) Calculer le coefficient de diffusion K pour le composé de masse 3 250 Da.

On observe quelquefois en CES des valeurs de K supérieures à 1. Interpréter ce phénomène

Exercice 7.2

On veut séparer par chromatographie de perméation de gel, un mélange de 4 étalons de polystyrène dont les masses moléculaires sont de 9 200, 76 000, $1,1 \times 10^6$ et 3×10^6 daltons. On dispose de 3 colonnes dont les domaines de perméation sont les suivants :

A : 70 000 à 4×10^5 Da ; B : 10^5 à $1,2 \times 10^6$ Da ; C : 10^6 à 4×10^6 Da

Comment peut-on séparer ces 4 polymères en une seule opération, sachant qu'on peut mettre bout à bout deux colonnes ?

Exercice 7.3

En chromatographie d'exclusion stérique, après injection de polystyrènes étalons, on trouve une relation entre masse molaire et temps de rétention de la forme suivante :

$$\log M = 5,865 + 1,411 t_R - 0,333 t_R^2 + 0,016 t_R^3 \quad (1)$$

où M est la masse molaire en Dalton et t_R le temps de rétention en min.

a) Calculer, à partir de cette relation, la masse molaire d'un soluté qui éluerait avec un temps de rétention égal à 7,48 min dans l'hypothèse où ce polymère est monomasse.

b) En réalité, le polymère monomasse n'existe pratiquement pas (excepté pour les étalons).

On définit une masse molaire moyenne $M_N = \frac{\sum_i N_i M_i}{\sum_i N_i}$ (2) et une masse molaire moyenne

pondérée $M_W = \frac{\sum_i N_i M_i^2}{\sum_i N_i M_i}$ (3) où M_i est la masse molaire d'un polymère éluant dans

l'intervalle de temps correspondant à un pic chromatographique et N_i le nombre de moles de ce polymère. Un logiciel de calcul tranche le pic chromatographique, détermine pour chaque tranche la masse molaire associée et l'aire A_i . En supposant le coefficient de réponse k du détecteur constant au cours du pic chromatographique, et en utilisant la relation de base $m_i = N_i \cdot M_i = k \cdot A_i$, transformer les relations (2) et (3) en utilisant uniquement A_i et si besoin M_i .

c) Un rapport chromatographique a donné les résultats suivants :

T_R	6,95	7,05	7,15	7,25	7,35	7,45	7,55	7,65	7,75	7,85	7,95	8,05
A_i	0	0	1,77	8,53	17,74	40,36	19,44	9,32	2,03	0	0	0
M_i												

Compléter ce tableau en utilisant la relation (1) et calculer les masses molaires M_N et M_W en utilisant les relations (2) et (3).

Chapitre 8

Électrophorèse capillaire et électrochromatographie

L'électrophorèse capillaire est une méthode séparative d'analyse qui s'est développée grâce aux acquis de la chromatographie liquide haute performance et des procédés plus anciens d'électrophorèse. Elle permet de séparer aussi bien les biomolécules que les composés de faible masse moléculaire difficiles à étudier par les procédés classiques d'électromigration sur support. Cette méthode encore appelée électrophorèse capillaire haute performance (ECHP) a fait sortir l'électrophorèse traditionnelle des laboratoires de biochimie. Incluse dans les pharmacopées, elle se prête à l'analyse quantitative. Dans un proche domaine l'électrochromatographie capillaire se développe rapidement. Elle correspond à une méthode hybride qui rassemble certains avantages propres à la CLHP et à l'ECHP. Elle est caractérisée par des valeurs très grandes de l'efficacité.

8.1 DE L'ÉLECTROPHORÈSE DE ZONE À L'ÉLECTROPHORÈSE CAPILLAIRE

L'électrophorèse capillaire correspond à une adaptation de la méthode générale d'électrophorèse. Cette technique séparative repose sur la migration dans un champ électrique et au contact d'un support approprié, des espèces présentes dans l'échantillon en solution, porteuses ou non d'une charge électrique globale.

■ Dans la technique d'électrophorèse semi-manuelle classique, largement utilisée dans le domaine de la bioanalytique, on utilise une bandelette de matière plastique recouverte d'une substance poreuse imprégnée d'un électrolyte. Ses extrémités plongent dans deux réservoirs indépendants contenant également cet électrolyte et reliés aux électrodes d'un générateur de tension continue (fig. 8.1). L'échantillon est déposé sous forme d'un petit trait transversal sur la bandelette, éventuellement refroidie et emprisonnée entre deux plaques isolantes. Les espèces hydratées présentes migrent en un temps très variable, allant de quelques secondes à plus d'une heure, vers l'une ou l'autre des extrémités de la bandelette. Chaque composé se différencie par sa mobilité, mais l'absence d'un front de solvant mesurable oblige à repérer la distance de migration par rapport à celle d'une substance à usage de marqueur interne. La détection des espèces, après migration, s'effectue généralement en les transférant par un

procédé par contact sur une membrane, où elles sont révélées au moyen de sels argentiques ou avec le bleu de Coomassie® ou d'autres réactifs particuliers (fig. 8.1). On peut également utiliser des marqueurs contenant des isotopes radioactifs à usage de traceurs (^{32}P ou ^3H). Le tracé obtenu est exploité de la même manière qu'en CCM.

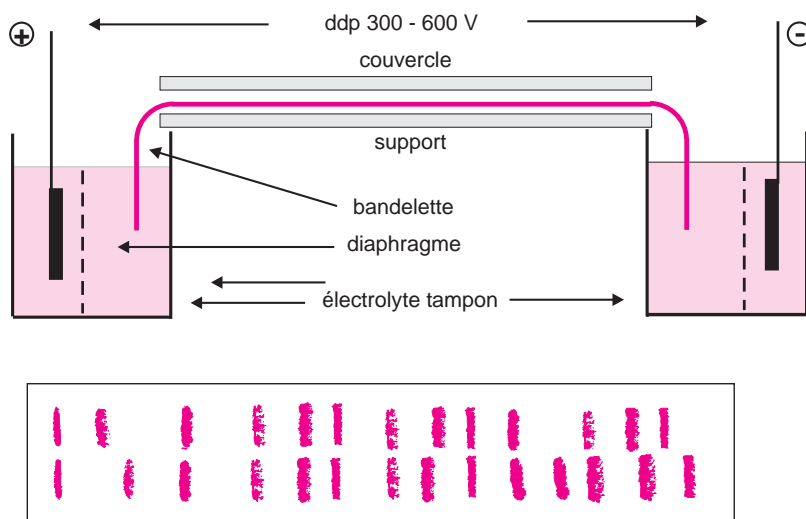


Figure 8.1 Electrophorèse de zone : principe d'une installation.

Chaque compartiment est séparé par un diaphragme afin d'éviter la contamination de l'électrolyte par les produits secondaires qui se forment au contact des électrodes. Selon les cas, on opère soit à intensité, soit à tension, soit à puissance constante. Aspect caractéristique d'une analyse après révélation. Pour mettre en évidence les protéines ou les acides aminés on utilise souvent la ninhydrine. Ce réactif se transforme au contact de l'acide aminé qu'il dégrade avec apparition d'un composé instable qui réagit à son tour sur une seconde molécule de ninhydrine pour donner le « violet de Ruhemann » voir à ce propos la figure 4.11.

En électrophorèse capillaire, le support plan de la technique classique est remplacé par un tube capillaire ouvert à ses extrémités, en verre de silice de très faible diamètre (15 à 150 μm). Ce capillaire, d'une longueur L variant entre 20 et 80 cm, est rempli d'un électrolyte tampon (fig. 8.2). La différence de potentiel appliquée peut atteindre 600 V/cm, mais l'intensité ne doit pas dépasser une centaine de microampères, afin que la puissance dissipée reste inférieure à 3 W. Pour limiter l'échauffement du capillaire il est préférable de le placer dans une enceinte thermostatée, sachant également que la température influe sur les temps de migration.

Un détecteur est placé à la distance ℓ de l'extrémité amont du capillaire près du compartiment cathodique. Le signal obtenu est à la base de l'obtention de l'*électrophorégramme* (fig. 8.2) qui donne des renseignements sur la composition de l'échantillon. Ne sont détectées que les espèces qui se dirigent vers la cathode.

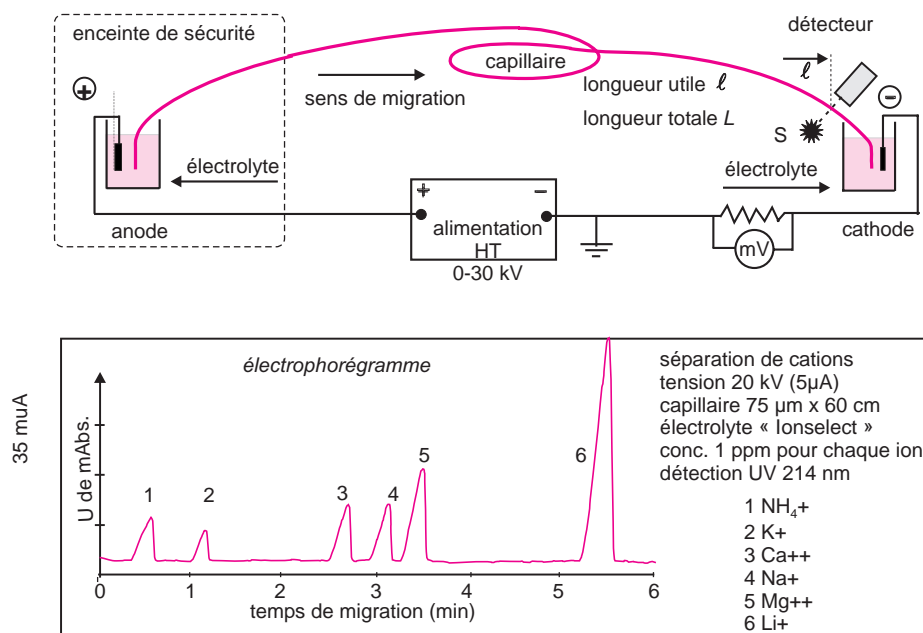


Figure 8.2 Une installation d'électrophorèse capillaire.

L'électrolyte est une solution aqueuse ionique, filtrée, dégazée contenant divers additifs. L'échantillon est introduit dans la partie amont du capillaire (cf. 8.3). Au-delà de 5 – 600 V/cm (ddp totale 30 kV si $L = 50$ cm) une isolation particulière devient nécessaire pour éviter arcs et fuites de courant en atmosphère humide. La distance effective de migration ℓ est plus courte d'une dizaine de centimètres que la longueur totale L du capillaire. En bas : un électrophorégramme typique d'une séparation de quelques cations (ordonnées en unités de milliabsorbance). L'électrolyte est un mélange commercial. La non-symétrie des pics est due à ce que les cations de l'échantillon vont plus vite que les ions de l'électrolyte. Ils seraient symétriques si ces vitesses étaient pratiquement identiques (reproduit avec l'autorisation de la société Waters).

8.2 MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE ET FLUX ÉLECTRO-OSMOTIQUE

Les particules en suspension dans un liquide, de même que les molécules solvatées, peuvent porter une charge électrique résultante dont la grandeur et le signe dépendent à la fois de leur taille, de leur nature et de celle de l'électrolyte, en particulier de son pH (fig. 8.3). Cette charge provient de la fixation, à leur surface, d'ions contenus dans l'électrolyte tampon.

Sous l'effet de divers phénomènes ou actions agissant simultanément, température, viscosité, différence de potentiel, ces particules vont avoir des vitesses de migration d'autant plus grandes qu'elles seront plus petites et porteuses de charges plus importantes.

Pour chaque ion la *vitesse limite de migration* v_{EP} résulte de l'équilibre entre la force électrique F qui s'exerce dans le champ E sur la particule de charge q , et les forces de frottement qui découlent de la viscosité η du milieu. La séparation dépend ainsi du rapport volume/charge de l'ion hydraté. Les espèces neutres se séparent mal entre elles, à moins

d'ajouter à l'électrolyte un agent ionique pouvant s'associer avec elles et provoquer leur entraînement différentiel.

Hückel a proposé une équation rendant compte de l'influence de ces facteurs sur la vitesse électrophorétique v_{EP} d'un ion assimilé à une sphère de rayon r .

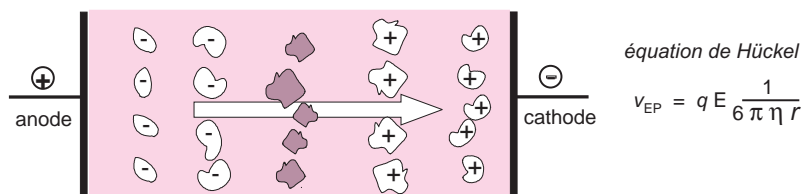


Figure 8.3 Équation de Hückel.

Influence de la charge nette, du champ électrique, du volume de l'ion et de la viscosité de la solution sur la vitesse de migration dans un électrolyte animé d'un flux électro-osmotique (cf. 8.2.2). La séparation dépend approximativement du rapport masse/charge de chaque espèce. Les anions de petite taille arrivent en dernier car ce sont les ions qui progresseraient le plus vite vers l'anode, s'il n'y avait pas le flux électro-osmotique qui les drainent, bien malgré eux, dans l'autre sens.

Les espèces présentes dans l'échantillon sont soumises à deux effets principaux qui se manifestent pour les ions comme pour les molécules ou les micelles. Il s'agit d'une part de leur *mobilité électrophorétique* propre et d'autre part du *flux* ou *écoulement électro-osmotique*,

8.2.1 Mobilité électrophorétique — électromigration

Tout composé porteur d'une charge électrique se déplace dans l'électrolyte à une vitesse v_{EP} qui dépend des conditions de l'expérience et de sa mobilité électrophorétique propre μ_{EP} . Ce paramètre accessible (cf. 8.2.3) est défini à partir de la vitesse de migration électrophorétique du composé et du champ électrique E (expression 8.1) :

$$\mu_{EP} = v_{EP}/E = v_{EP}L/V \quad (8.1)$$

L désigne la longueur totale du capillaire et V la ddp appliquée à ses extrémités. On affecte à la mobilité électrophorétique un signe (+ ou -) selon la nature cationique ou anionique de l'espèce ; μ_{EP} ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) est nulle pour une espèce globalement neutre.

On peut obtenir μ_{EP} à partir d'un électrophorégramme, en calculant v_{EP} du composé dans un champ E connu en tenant compte de la vitesse de l'électrolyte (cf. 8.2.2).

8.2.2 Mobilité électro-osmotique — électro-osmose (EOS)

Le second facteur qui contrôle la migration des solutés est l'écoulement de l'électrolyte — encore appelé *flux électro-osmotique* caractérisé par sa *mobilité électro-osmotique*, μ_{EOS} . On définit μ_{EOS} par la relation 8.2 (les lettres ayant la même signification que pour la formule 8.1).

$$\mu_{EOS} = v_{EOS}/E = v_{EOS}L/V \quad (8.2)$$

Pour calculer μ_{EOS} on doit déterminer v_{EOS} . Celle-ci correspond à la vitesse d'écoulement dans l'électrolyte des espèces sans charge globale. On y accède à partir du temps de migration t_{mn} que met un marqueur neutre à usage de traceur pour parcourir la distance effective ℓ du capillaire, $v_{\text{EOS}} = \ell/t_{\text{mn}}$. On choisit comme marqueur une molécule organique, non polaire au pH de l'électrolyte utilisé, et facilement détectable par absorption dans le proche UV (ex. acétone, oxyde de mésityle ou alcool benzylique).

Le flux électro-osmotique, qui règle le déplacement de toutes les espèces présentes dans l'échantillon a plusieurs causes qui gravitent autour de l'effet de la paroi interne du capillaire. En effet un capillaire de verre de silice n'ayant pas subi de traitement particulier comporte en surface de nombreux groupements silanols ($\text{Si}-\text{OH}$) qui sont ionisés en silanoates ($\text{Si}-\text{O}^-$) si le pH de l'électrolyte est supérieur à 3. Ces sites anioniques fixes attirent des cations présents dans la solution et les ordonnent en deux couches dont l'une est collée à la paroi et l'autre quelque peu mobile (fig. 8.4). Entre ces deux couches naît une différence de potentiel (le « potentiel Zéta »), dont la valeur dépend de la concentration de l'électrolyte et du pH. Plus au cœur de la solution, le champ électrique provoque la migration des cations vers la cathode. Ces ions étant solvatés par des molécules d'eau, il apparaît un flux d'électrolyte qui se dirige dans le même sens. Les anions sont entraînés : ils progressent « contre-électro-osmotiquement ».

En règle générale, une surface négative provoque un flux électro-osmotique dirigé vers la cathode. En revanche si on ajoute un surfactant, tel un tétra alkylammonium, pour inverser la polarité de la paroi, le flux électro-osmotique se dirige vers l'anode (fig. 8.5).

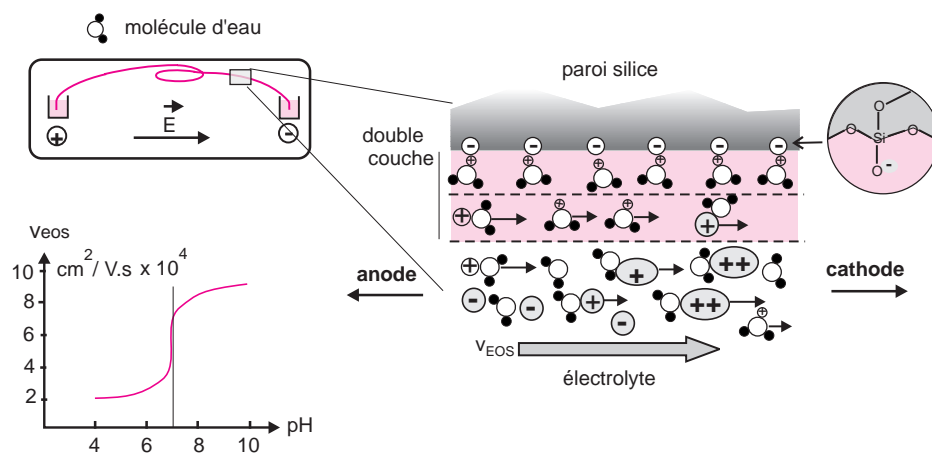


Figure 8.4 Apparition d'un flux électro-osmotique dans un capillaire rempli par un électrolyte.

Si la paroi n'a pas subi de traitement (paroi polyanionique négative de verre ou de silice) il apparaît un effet de pompage qui aspire le liquide du compartiment anodique vers le compartiment cathodique : c'est le flux électro-osmotique. Son origine fait intervenir le potentiel existant à la surface de la paroi. Si on annule ce potentiel en recouvrant la paroi d'un film apolaire (film polyhydroxyvinyle hydrophile ou octadécyle, par exemple), ce flux n'existe plus. Le flux électro-osmotique est proportionnel à l'épaisseur de la double couche cationique qui elle-même diminue si la concentration de l'électrolyte tampon augmente. Il est aussi bien sûr très dépendant du pH. Entre pH 7 et 8, v_{EOS} peut augmenter de 35 %.

■ En traitant la paroi avec un alkylsilane pour la rendre hydrophobe, les protéines deviennent séparables, alors qu'elles ont tendance à rester accrochées à la paroi lorsque celle-ci n'est pas traitée. À la limite, on peut ne récupérer qu'une seule catégorie d'ions, en fonction de la direction du champ appliqué.

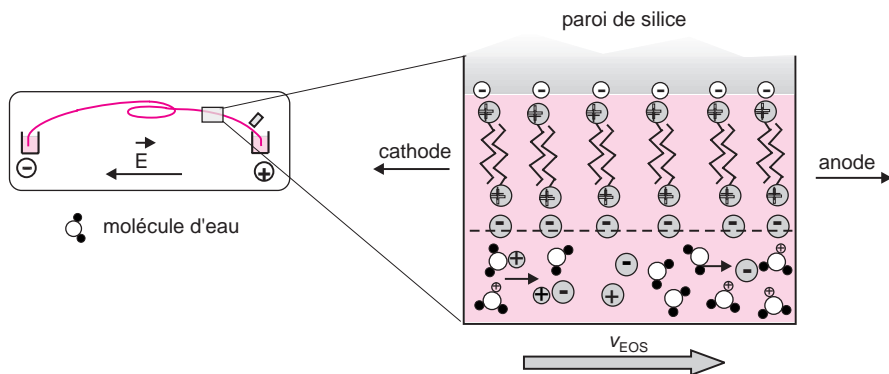


Figure 8.5 Effet d'un surfactant cationique sur la paroi de silice.

Les migrations devant se faire vers l'extrémité où se trouve le détecteur, on doit inverser les pôles de l'appareil. Les espèces anioniques progressent naturellement dans le même sens que le flux d'électrolyte, donc vers le détecteur.

8.2.3 Mobilité apparente

En fonction de ce qui précède, chaque ion a donc une vitesse apparente de migration v_{app} qui dépend de la vitesse électrophorétique et de la vitesse du flux électro-osmotique (relation 8.3) :

$$v_{app} = v_{EP} + v_{EOS} \quad (8.3)$$

v_{app} est aisément calculable à partir de l'électrophorégramme à partir de ℓ , longueur utile du capillaire entre les points d'injection et de détection et de t_m , son temps de migration.

v_{app} est donnée par la relation :

$$v_{app} = \ell / t_m$$

La mobilité électrophorétique apparente μ_{app} , définie par une relation analogue à 8.1 ou 8.2, est telle que :

$$\mu_{app} = \frac{v_{app}}{E} = v_{app} \frac{L}{V} \quad \text{par conséquent on a :} \quad \mu_{app} = \frac{\ell \cdot L}{t_m \cdot V} \quad (8.4)$$

En combinant le flux électro-osmotique de l'électrolyte et la mobilité apparente il est donc possible de calculer la mobilité électrophorétique vraie des espèces porteuses de charges. À partir de 8.3, on écrira :

$$\mu_{EP} = \mu_{app} - \mu_{EOS} \quad (8.5)$$

soit :

$$\mu_{EP} = L \cdot \ell / V \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{mn}} \right) \quad (8.6)$$

■ La séparation des espèces anioniques est très courante en ECHP. Généralement on inverse les pôles de l'alimentation, le détecteur étant alors du côté anodique. Le flux électro-osmotique est ainsi inversé. Seuls seront détectés les anions dont les μ_{EP} seront supérieures à μ_{EOS} (fig.8.6).

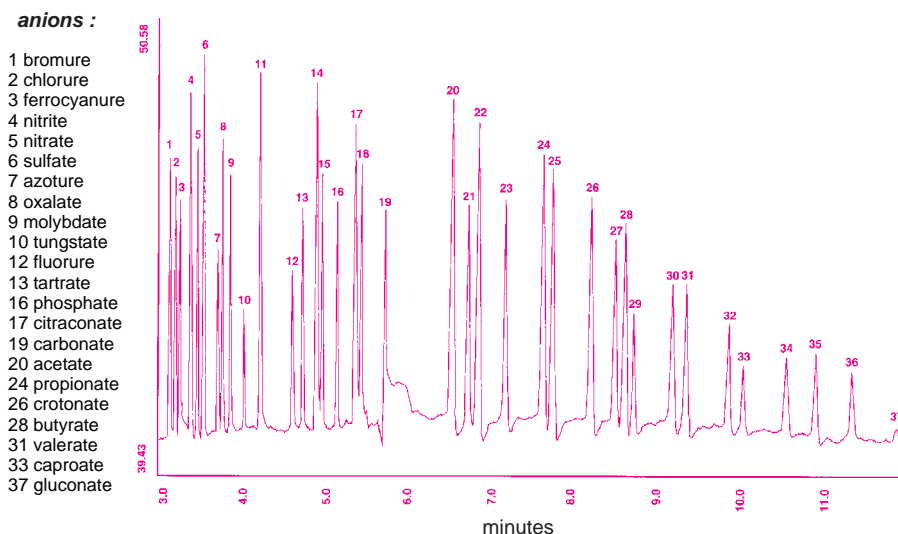


Figure 8.6 Un électrophorégramme.

Séparation d'un mélange complexe d'anions. La non symétrie des pics souvent observée (voir aussi figure 8.2) provient des variations du champ électrique tout au long du capillaire par suite de compositions ioniques variables. Seuls les anions les plus courants sont indiqués (reproduit avec l'autorisation de la société ATI Unicam).

8.3 INSTRUMENTATION

8.3.1 Modes d'injection

Pour introduire un microvolume d'échantillon, qui ne doit pas dépasser 1 % de la longueur utile du capillaire sous peine de voir la résolution diminuer, deux procédés sont utilisés :

- **l'injection hydrostatique.** Elle consiste à plonger l'extrémité du capillaire dans l'échantillon en solution (également un électrolyte) et à provoquer une aspiration à l'autre extrémité. On peut améliorer le procédé en exerçant une pressurisation d'environ 50 mbar sur la solution échantillon.
- **l'injection par électromigration.** Elle est utilisable en électrophorèse sur gel, et consiste à immerger pendant un certain temps l'extrémité du capillaire dans l'échantillon porté à un potentiel (50 mV/cm) dont on choisit la polarité par rapport à l'autre extrémité. Par opposition avec le procédé précédent, ce mode d'injection provoque une action discriminante sur les composés présents, qui conduit à faire l'analyse sur une fraction dont la composition est différente de celle de l'échantillon de départ. Cette méthode est optimisée pour chaque mélange.

■ La méthode de l'injection hydrostatique rend l'opération moins précise qu'en CLHP. Il n'existe pas de boucles d'injection pour des volumes qui sont ici compris entre 5 et 50 nL. La quantité rentrant dans le capillaire dépend de beaucoup de paramètres dont ceux qui figurent dans la formule de Poiseuille relative au débit dans un tuyau d'un liquide ayant une viscosité dynamique η . L'application de cette formule donnerait une valeur approximative de ce qu'on pourrait appeler le « débit entrant » dans le capillaire.

$$D = \Delta P \frac{\pi r^4}{8\eta L}$$

Son intérêt est plutôt de montrer que si le rayon r du capillaire est doublé le volume entrant sera 16 fois plus grand, ou encore que ce volume est proportionnel à la différence de pression ΔP et qu'une augmentation de la longueur L du capillaire produit l'effet inverse. En conclusion pour améliorer les performances quantitatives en ECHP, il faut utiliser un étalon interne. On utilisera soit une solution de dilution contenant l'étalon interne pour préparer toutes les solutions soit on ajoutera un volume précis d'une solution de l'étalon à ces mêmes solutions.

8.3.2 Modes de détection

► **Détection UV/VIS** (cf. chapitre 9). On mesure l'intensité de la lumière passant à travers le capillaire dont une petite zone de revêtement opaque a été éliminée. Le capillaire coupe le trajet optique allant de la source au photomultiplicateur (fig. 8.7). On évite ainsi tout volume mort. Le très faible parcours optique dans le capillaire rend peu sensible ce mode de détection si la solution absorbe peu, d'autant que souvent les matrices sont elles-mêmes absorbantes.

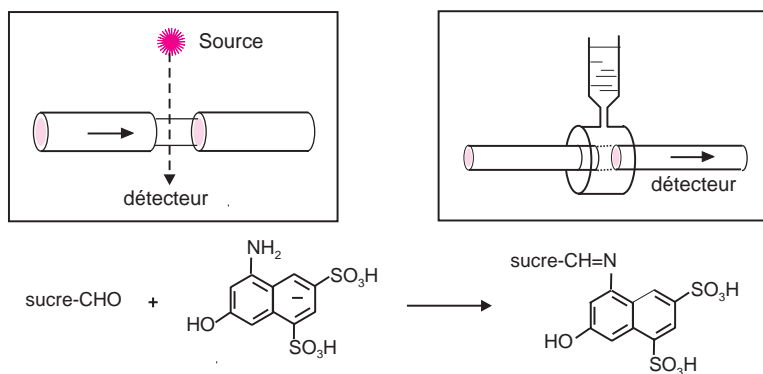


Figure 8.7 Détection UV et dérivation post-séparation.

a) La cellule de mesure est constituée par le capillaire lui-même; b) la post-dérivation peut être réalisée en coupant le capillaire un peu en amont du détecteur et en introduisant le réactif. Exemple de réaction de dérivation pour transformer un sucre en un dérivé fluorescent.

■ **Détection UV/Vis en mode inverse.** Les ions inorganiques qui absorbent très peu la lumière peuvent néanmoins être détectés par mesure d'absorbance : on choisit un électrolyte rendu très absorbant par ajout d'un chromate ou d'un phthalate. Dans ces conditions, lorsqu'un ion de l'échantillon arrive au niveau du détecteur, l'absorbance diminue, ce qui

conduit à des pics « en négatif » (fig. 8.8). Cette variation d'absorbance est reliée linéairement à la concentration de l'ion détecté.

- **Détection par fluorescence.** Ce procédé est plus sensible si on emploie une source laser très intense. Pour étendre le champ d'application de cette forme de détection on peut faire une pré- ou postdérivation des analytes pour les rendre porteurs d'un fluorophore (fig. 8.7).
- **Détection électrochimique.** Réalisable en insérant de minuscules électrodes dans le capillaire.
- **Détection par spectrométrie de masse.** Le très faible débit du capillaire se prête bien aux méthodes d'ionisation à pression atmosphérique (cf. chapitre 15), ce qui permet l'étude des composés biologiques (fig. 15.7). Procédé surtout utilisé en analyse pharmaceutique.

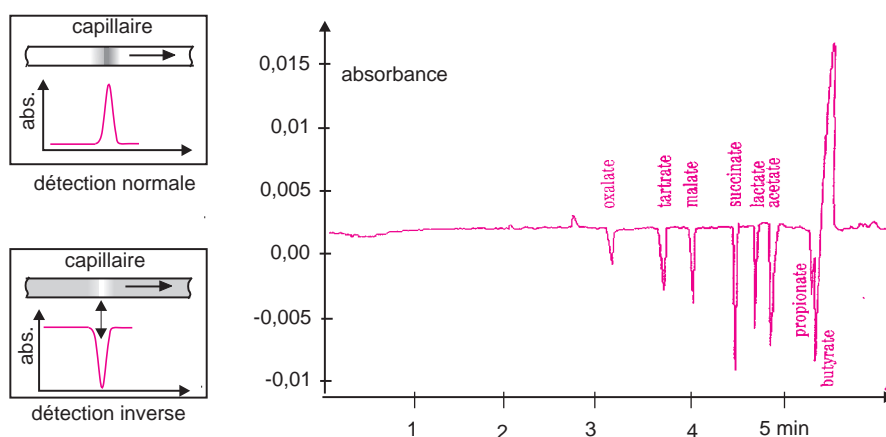


Figure 8.8 Séparation des principaux acides organiques dans un vin blanc par détection inverse. Les deux acides malique et lactique témoignent de la fermentation classique malo-lactique (selon une note d'application de la société TSP).

8.4 TECHNIQUES ÉLECTROPHORÉTIQUES

8.4.1 Électrophorèse capillaire de zone (CZE)

C'est le procédé d'électrophorèse le plus courant. Le capillaire est parcouru par l'électrolyte constitué soit par un milieu tampon qui, selon l'application, est acide (phosphate ou citrate) ou basique (borate), soit par un ampholyte (molécule possédant une fonction acide et une fonction basique). Le flux électro-osmotique croît avec le pH de la phase liquide. Il peut être rendu nul. Ce procédé est encore appelé électrophorèse en solution libre par opposition à la CGE (§ 8.4.3).

8.4.2 Électrophorèse capillaire électrocinétique micellaire (MEKC)

Dans cette variante au procédé de base décrit précédemment, on ajoute dans la phase mobile un composé cationique ou anionique, tel le dodécylsulfate de sodium, pour former des micelles dont le caractère ionique les rend porteuses de charges. Ces micro-gouttelettes, qui ne

sont pas miscibles à la solution, emprisonnent les composés neutres, plus ou moins efficacement, par affinité du type hydrophile/hydrophobe (fig. 8.9). Ce type d'électrophorèse est donc utile pour les composés qui ont tendance à migrer sans séparation. En ajoutant des cyclodextrines modifiées on peut déterminer la pureté optique des composés. Il se forme alors des complexes d'inclusion de stabilité différente avec les couples d'énantiomères (*cf.* 3.6 et fig. 8.9).

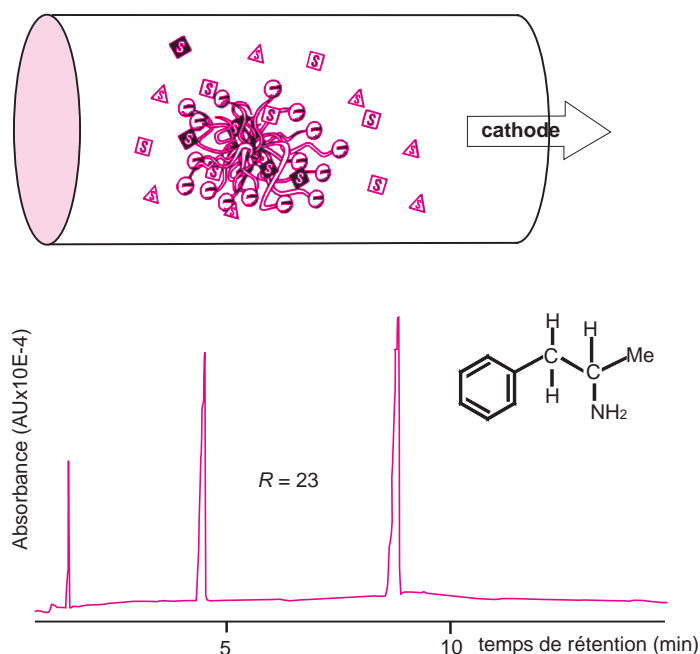


Figure 8.9 Séparation de composés neutres par usage de surfactants (technique MEKC).

La partie lipophile du surfactant, ici un alkylsulfonate, se fixe plus ou moins facilement sur certaines espèces du substrat S. Les micelles insolubles ainsi formées, bien que chargées négativement, sont ensuite entraînées vers la cathode par le flux électro-osmotique (adapté d'un document Hewlett-Packard). Électrophorégramme d'un échantillon d'amphétamine racémique en présence de cyclodextrine. L'électrolyte NaH_2PO_4 25 mMol (pH 2,5) contient 5 % de gamma-cyclodextrine polysulfatée. À ce pH le flux électro-osmotique est négligeable. Les ions hydrogénosulfate des cyclodextrines se dirigent vers l'anode entraînant les molécules d'amphétamines retenues dans leur cavité hydrophobe. Les deux énantiomères en quantité égale forment deux complexes diastéréomériques qui migrent à des vitesses différentes. L'anode est ici raccordée côté détecteur. Reproduit avec l'autorisation de la société Beckman Coulter Inc. (USA).

8.4.3 Électrophorèse capillaire sur gel (CGE)

C'est la transposition de l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) ou d'agarose. Le capillaire est rempli avec un électrolyte contenant un gel. Celui-ci produit un effet de filtration qui ralentit les grosses molécules et qui minimise les phénomènes de convection ou de diffusion. Les oligonucléotides, peu fragiles, peuvent être ainsi séparés. Le flux électro-osmotique reste faible.

■ Dans l'électrophorèse sur plaque, le support sur lequel se produit la migration peut contenir un gel (amidon ou mieux polyacrylamide) imprégné de l'électrolyte. Si ce dernier contient du dodécylsulfate de sodium (SDS), on désigne cette forme d'électrophorèse sur gel par son sigle anglais SDS PAGE. La séparation se trouve améliorée par un phénomène de filtration qui se superpose aux forces électriques. Ces techniques sont surtout utilisées pour les trois grandes catégories de biomolécules : les polypeptides (protéines), les oligonucléotides (fragments d'ADN ou d'ARN) et les mono- et polysaccharides (hydrates de carbone).

8.4.4 Électrophorèse à focalisation isoélectrique (CIEF)

Cette technique également connue en électrophorèse sur support, consiste à créer un gradient de pH linéaire dans un capillaire à paroi traitée contenant un ampholyte. Le capillaire plonge dans H_3PO_4 à l'anode et dans NaOH à la cathode. Chaque composé migre et se focalise au pH qui a même valeur que son potentiel isoélectrique (au pI, sa charge nette est nulle). Ensuite, sous l'effet d'une pression hydrostatique et en maintenant le champ électrique, on déplace les espèces séparées vers le détecteur. Les résolutions élevées obtenues avec ce procédé, permettent notamment de séparer des peptides dont les pI ne diffèrent que de 0,02 unité pH.

8.5 PERFORMANCES

Les performances de l'électrophorèse capillaire sont intrinsèquement comparables à celles de la chromatographie liquide qu'elle complète utilement pour les séparations de biomolécules. La sensibilité est très grande : en employant un mode de détection basé sur la fluorescence déclenchée par laser (LIF), on peut déceler quelques milliers de molécules vraies après dérivation. La mise au point d'une séparation revient à trouver un milieu tampon adapté au problème à résoudre. La quantité requise d'échantillon est très faible et la consommation de réactifs ou de solvants est négligeable (fig. 8.10).

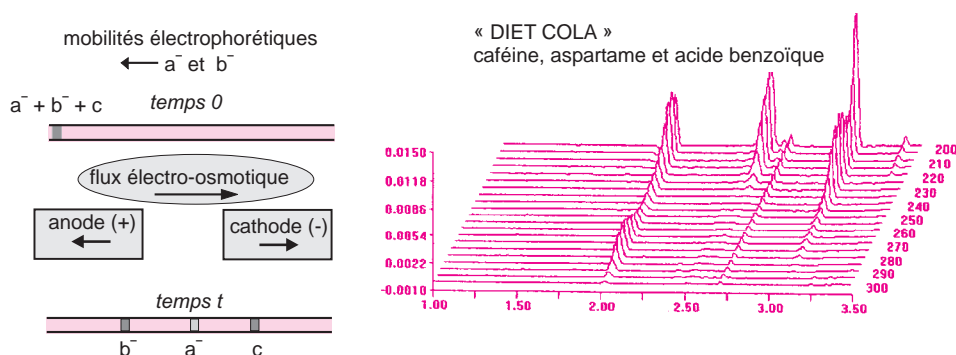


Figure 8.10 Séparation électrocinétique de trois espèces a^- , b^- et c .

On a choisi ici un flux électro-osmotique se dirigeant vers la cathode et entraînant avec lui toutes les espèces, chargées ou neutres. Les espèces négatives bien qu'attirées par le pôle positif, ne peuvent vaincre le flux électro-osmotique et se déplacent par conséquent vers la cathode. Séparation de la caféine (c) et des anions de l'aspartame (a^-) et du benzoate (b^-), d'un échantillon de DIET-COLA; présentation sous forme d'un électrophorogramme 3D (reproduit avec l'autorisation de la société TSP).

Cependant la reproductibilité des analyses est moins sûre qu'en CLHP car beaucoup de facteurs subtils peuvent affecter la répétabilité des volumes injectés. En utilisant un étalon interne, l'écart-type relatif (CV) est de l'ordre de 2 % dans la méthode d'introduction hydrostatique. Quand l'efficacité N des séparations est suffisamment grande, il devient possible de séparer les isotopes d'un même élément (fig. 8.11).

À la frontière de la chimie classique, l'EHP dans sa version *lab-on-a-chip* intéresse les biologistes moléculaires pour analyser les produits de PCR et de dégradation des protéines.

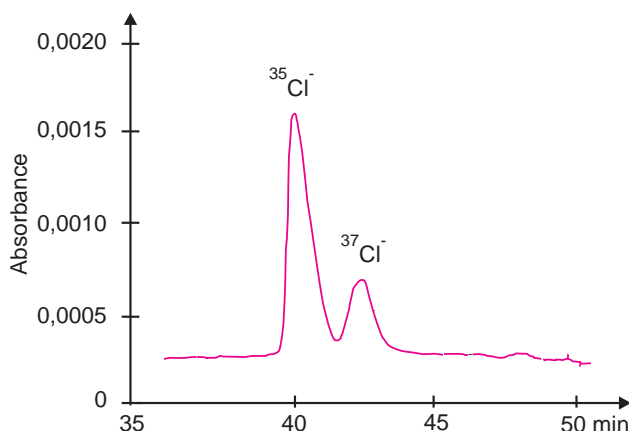


Figure 8.11 Séparation des isotopes du chlore.

Lorsque l'efficacité devient très grande, les isotopes d'un même élément conduisent à deux pics bien séparés comme dans cet exemple. Conditions : capillaire de $75\mu\text{m}/47\text{cm}$. $V = 20\text{ kV}$, $T = 25^\circ\text{C}$, électrolyte : chromate/borate pH = 9,2. Lucy, T. McDonald, *Anal. Chem.* 1995, **67**, 1074).

Les paramètres de séparation (efficacité, facteur de capacité, sélectivité, résolution) sont accessibles à partir des électrophorégrammes en utilisant soit les mêmes formules qu'en chromatographie, soit des formules spécifiques à l'EHP. Ainsi l'expression classique, basée sur la seule diffusion, donnant l'efficacité N , qui peut atteindre 10^6 plateaux/mètre de capillaire permet de calculer le coefficient de diffusion D ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) du soluté choisi.

Ce dernier paramètre est relié à la dispersion σ et au temps de migration t_m par la loi d'Einstein ($\sigma^2 = 2D \cdot t_m$). On aboutit à la relation 8.7 (ou 8.8 si on élimine t_m en utilisant l'expression 8.4) :

$$D = \ell^2 / 2 N t_m \quad (8.7) \quad \text{ou} \quad D = \frac{\mu_{\text{app}}}{2 N} \cdot V \cdot \frac{\ell}{L} \quad (8.8)$$

La relation 8.8 montre que l'efficacité croît avec la différence de potentiel appliquée.

Les macromolécules, dont les facteurs de diffusion sont plus petits que pour les petites molécules, conduisent à de meilleures séparations (fig. 8.12).

Enfin en EHP, la résolution R entre deux pics peut être calculée en faisant intervenir l'efficacité N , la différence de vitesse de migration entre les deux solutés et leur vitesse moyenne (8.9) :

$$R = \sqrt{N} / 4 \cdot \frac{\Delta v}{\bar{v}} \quad (8.9)$$

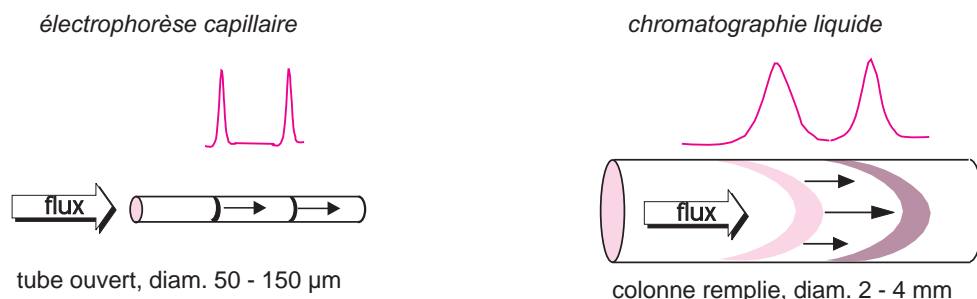


Figure 8.12 Comparaison des effets conjugués de la diffusion et du mode de progression de la phase mobile en ECHP et en CLHP.

La diffusion qui croît comme le carré du diamètre du tube est donc plus petite en électrophorèse qu'en chromatographie liquide, surtout s'il s'agit en plus de composés de masse moléculaire élevée. D'autre part, en EC, l'électrolyte est tracté par la paroi, alors qu'il est poussé en ECHP, autrement dit en EC le profil du flux hydrodynamique est plan, presque parfait et non parabolique comme en CLHP.

8.6 ÉLECTROCHROMATOGRAPHIE CAPILLAIRE (ECC)

En associant l'électromigration des ions, propre à l'électrophorèse, et les effets du partage entre phases, propre à la chromatographie, on a développé sur ce concept, une méthode originale de séparation miniaturisée baptisée électrochromatographie capillaire.

La mise en œuvre nécessite un capillaire rempli avec une phase stationnaire constituée par des particules de très petit diamètre (1 à 3 µm). Il peut s'agir de particules à base de silice ou de polymères polaires ou de diverses structures poreuses continues (colonnes monolithiques). Le rôle de la phase stationnaire est double : elle agit comme un matériau retenant plus ou moins les composés (ex. RP-18) et, en outre, elle aide à la migration de l'électrolyte (fig. 8.13). Il faut donc qu'il subsiste, sur la surface externe des particules, suffisamment de groupements polaires (silanols par exemple) pour produire un flux électro-osmotique, afin que le remplissage se comporte de façon analogue à la paroi d'un capillaire non traité.

En électrochromatographie, il n'y a pas de perte de charge : chaque ion H_3O^+ migre de lui-même sous l'effet du champ électrique, la pompe devient donc inutile, alors qu'en chromatographie liquide, il en faudrait une travaillant sous une pression de près d'un millier de bars pour faire passer la phase mobile au travers d'une telle colonne.

Un changement de composition de la phase mobile intervient à la fois sur le flux électro-osmotique et sur la sélectivité.

Le facteur de séparation est très élevé mais un certain nombre de problèmes demeurent, dont l'effet des modifiants organiques sur le flux électro-osmotique et le contrôle précis du volume d'échantillon introduit dans le capillaire.

colonne L = 10 cm
 l = 6,5 cm ; diam. 100 µm
 silice 1,5 µm ODS
 ddp : voir figure
 mélange :
 1 - naphthalène
 2 - fluoranthène
 3 - benz[a]anthracène
 4 - benzo[k]fluoranthène
 5 - benzo[ghi]perylène
 détecteur fluorimétrique

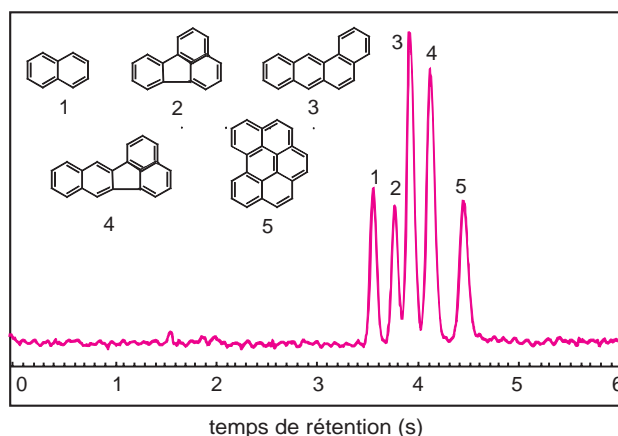
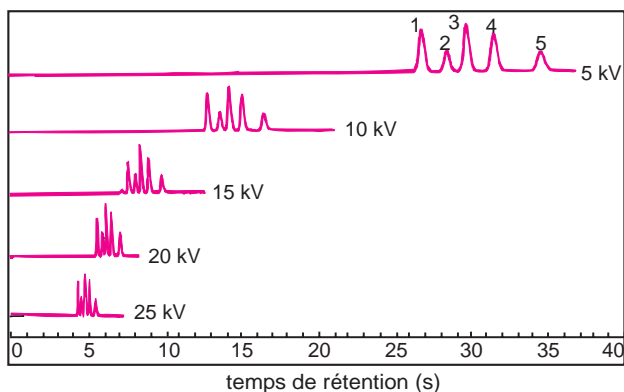
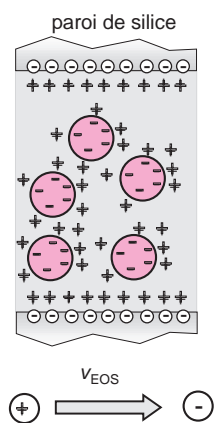


Figure 8.13 Séparation d'hydrocarbures aromatiques par électrochromatographie et représentation d'une section de capillaire rempli.

Les différents essais de séparation d'un même mélange de composés neutres en faisant varier la tension vérifient, en première approximation, la relation existant entre tension et vitesse du flux électro-osmotique. Dans cet exemple, l'emploi d'une colonne très courte et d'une tension élevée permet la séparation en quelques secondes (pour $V = 28$ kV) avec une bonne résolution d'un mélange de composés non ionisés. On atteint une grande efficacité par ce procédé (D.S. Anex et Coll., *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 4787-92). Parmi les matériaux de remplissage des capillaires, on trouve désormais des structures polymériques continues à base de polymères utilisant des méthacrylates ou des acrylamides.

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.esainc.com
www.waters.com

www.agilent.com
www.princetechnologies.nl

www.unimicrotech.com

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 8.1

Une installation d'électrophorèse en solution libre (CZE) comporte un capillaire de longueur totale $L = 32$ cm et de longueur effective $\ell = 24,5$ cm. La tension appliquée est de 30 kV. Dans les conditions de l'expérience réalisée le temps de migration t_{mn} d'un marqueur neutre est de 3 min.

- a) Calculer la mobilité électrophorétique μ_{EP} d'un composé dont le temps de migration apparent est de 2,5 min. Préciser les unités employées.
- b) Dans ces conditions, calculer le coefficient de diffusion de ce composé, en admettant que l'efficacité calculée est $N = 80\,000$.

Exercice 8.2

On considère une installation d'électrophorèse capillaire comportant un capillaire de verre de silice non-traitée, à « paroi négative », de $L = 1$ m de longueur totale et de $\ell = 90$ cm de longueur utile (jusqu'au détecteur). La différence de potentiel appliquée aux bornes du capillaire est de 20 kV. Le détecteur est situé vers l'extrémité cathodique du capillaire. L'électrolyte est un milieu tampon de pH 5. Un composé présent dans l'échantillon a un temps de migration $t_m = 10$ min.

- a) Peut-on en déduire si la charge nette portée par ce composé est positive ou négative ?
- b) Calculer la mobilité électrophorétique apparente μ_{app} de ce composé.
- c) Sachant qu'un marqueur neutre a un temps de migration t_m de 5 min, en déduire la valeur du flux électro-osmotique μ_{EOS} .
- d) Calculer la mobilité électrophorétique μ_{EP} du composé. En déduire le signe de sa charge nette.
- e) Que se passerait-il si on utilisait un capillaire à paroi traitée pour la rendre neutre ?
- f) En supposant que le pI du composé soit de 4, quel sera le signe de sa charge nette si on abaisse le pH de l'électrolyte à 3 ?
- g) Calculer N pour le composé étudié sachant que $D = 2 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.
- h) Connaissant la relation entre l'efficacité N et la diffusion D , expliquer pourquoi les petites molécules conduisent en électrophorèse capillaire à des séparations généralement moins bonnes que les grosses molécules, et pourquoi les séparations sont d'autant meilleures que le diamètre du capillaire est plus étroit.

Exercice 8.3

En EC, lorsque le capillaire contient un gel d'acrylamide en plus de l'électrolyte, on observe que la vitesse de migration est ralentie par un effet mécanique de filtration par le gel. Le phénomène est d'autant plus important que la molécule est plus grosse. On considère que la relation suivante est vérifiée :

$$\log M = a \cdot v + b$$

a et b sont deux constantes et M représente la masse moléculaire (Da) d'une molécule migrante dont la vitesse est v .

Dans une expérience destinée à mettre à profit cette relation pour calculer la masse moléculaire d'une protéine inconnue, on utilise deux témoins d'étalonnage :

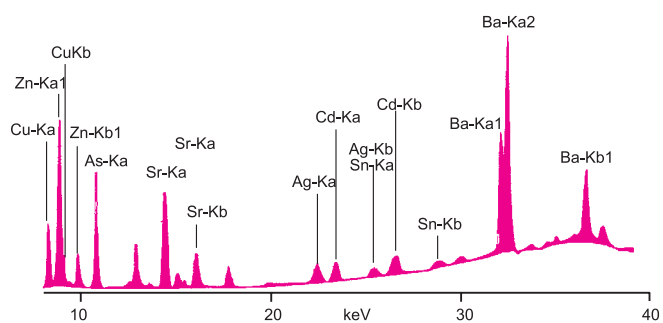
- l'ovalbumine ($M = 45\,000$ Da) dont la vitesse de migration est de $1,5\text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$
- la myoglobine ($M = 17\,200$ Da), dont la vitesse est de $5,5\text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$.

Dans cette même expérience, la protéine inconnue a une vitesse de migration de $3,25\text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$.

Calculer sa masse en daltons.

PARTIE 2

Méthodes spectrométriques



LES INVENTEURS DE LA COLORIMÉTRIE

La colorimétrie visuelle, une des plus anciennes méthodes d'analyse, déjà appliquée du temps des Grecs et des Romains, a commencé à prendre un caractère scientifique quand Pierre Bouguer, en 1729 émit le postulat selon lequel « si une certaine épaisseur d'un verre coloré absorbe la moitié de la lumière issue de la source, une épaisseur de verre double réduit cette lumière au quart de sa valeur initiale. »

Trente années plus tard, Jean-Henri Lambert (1728-1777) en fit la traduction mathématique : « le logarithme de la diminution de lumière (soit l'équivalent de l'inverse de la transmittance) est égal au produit de l'opacité du milieu par son épaisseur ».

Enfin en 1850, Auguste Beer établit la relation entre concentration et densité optique (on dit maintenant absorbance), ce qui a conduit à la forme actuelle de la loi de Lambert et Beer.

Parmi les différents dispositifs imaginés pour effectuer des dosages par colorimétrie visuelle, un des plus originaux fut décrit par Jules Duboscq en 1868.

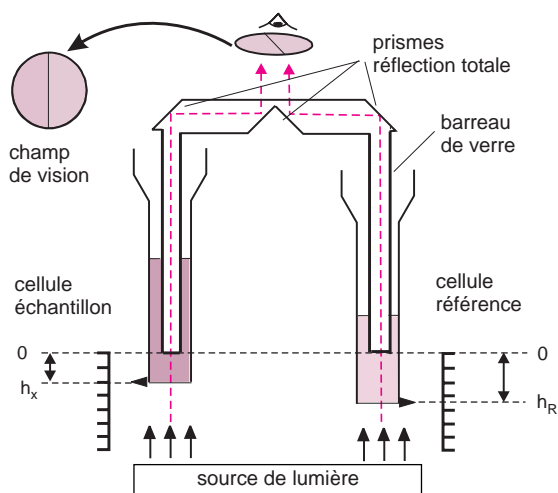
Cet instrument qui a été utilisé jusque vers les années 1960 permet de juxtaposer dans un même champ visuel, grâce à un système de prismes, les intensités lumineuses ayant traversé deux cuves identiques dont l'une contient l'échantillon de concentration C_X et l'autre un témoin connu (concentration C_R). L'expérimentateur ajuste la hauteur h_X de la solution à doser de telle façon qu'il atteigne l'égalité de teinte avec la solution témoin servant de référence (hauteur h_R). Dans ces conditions les absorbances sont égales.

Si $A_R = A_X$, on aura :

$$\varepsilon \cdot h_R \cdot C_R = \varepsilon \cdot h_X \cdot C_X$$

On en déduira C_X , concentration cherchée.

Ce comparateur à pénombre conduit à la concentration de l'espèce cherchée en exploitant la loi de Beer et Lambert par comparaison des épaisseurs traversées. L'observateur peut repérer l'égalité des teintes avec une grande précision.



Comparateur de Duboscq.

L'observateur règle l'égalité des intensités transmises suivant les deux voies, en faisant coulisser les tubes contenant les deux solutions à comparer, le long des deux barreaux fixes en verre. L'éclairage du fond des tubes est réalisé par une surface réfléchissante elle-même éclairée par une source lumineuse annexe.

Chapitre 9

Spectrométrie d'absorption de l'ultraviolet et du visible

*L'absorption des radiations lumineuses par la matière dans la plage spectrale s'étendant du proche ultraviolet au très proche infrarouge, soit entre 180 et 1 100 nm, a été abondamment étudiée d'un point de vue fondamental. Cette partie du spectre est désignée par l'« UV/Visible », parce qu'elle englobe les radiations perceptibles par l'œil humain. D'une manière générale elle apporte peu d'informations structurales, mais elle a, en revanche, beaucoup d'applications en analyse quantitative. Les calculs de concentration qui découlent de la loi de Beer et Lambert ont donné naissance à la méthode connue sous le terme général de **colorimétrie**. Cette méthode apparaît comme le cheval de labour de tout laboratoire d'analyses. Celle-ci s'applique non seulement aux composés qui possèdent un spectre d'absorption dans le visible mais aussi à tous ceux qui conduisent au moyen d'un réactif spécifique à un dérivé permettant une mesure d'absorbance. Les mesures d'absorption peuvent se faire avec tout un choix d'appareils qui vont des comparateurs de couleurs et autres colorimètres visuels simples, aux spectrophotomètres automatiques adaptés à l'analyse multicomposants. De plus, la chromatographie liquide et l'électrophorèse capillaire ont favorisé le développement de détecteurs UV/Visible perfectionnés, à l'origine d'un mode très courant d'obtention des chromatogrammes, accompagné de possibilités d'identification et de quantification des composés.*

9.1 LE DOMAINE SPECTRAL UV-VIS ET L'ORIGINE DES ABSORPTIONS

Ce domaine spectral est divisé en trois plages de longueurs d'onde appelées *proche UV* (185-400 nm), *visible* (400-700 nm) et *très proche infrarouge* (700-1 100 nm). La plupart des spectromètres vont de 185 à 900 nm. La limite inférieure des appareils dépend à la fois de la nature des matériaux optiques utilisés et de la présence ou non sur le trajet optique de l'air ambiant, sachant que le dioxygène et la vapeur d'eau absorbent de manière intense en dessous de 190 nm. Quelques instruments, à condition d'opérer sous vide, peuvent atteindre 150 nm avec des échantillons pris à l'état gazeux. C'est le domaine de l'*ultraviolet du vide*.

L'absorption lumineuse a pour origine l'interaction des photons de la source lumineuse avec les ions ou molécules de l'échantillon. Ainsi lorsqu'une molécule isolée absorbe un photon de l'UV/Visible, l'énergie correspondante est captée par un ou plusieurs de ses électrons superficiels. Il y a alors modification de son énergie électronique ($E_{\text{élec.}}$), l'une des trois composantes avec l'énergie de rotation ($E_{\text{rot.}}$) et l'énergie de vibration (E_{vib}) de

l'énergie mécanique totale de la molécule (formule 9.1). Sachant que la modification de $E_{\text{élec.}}$ entraîne des perturbations de $E_{\text{rot.}}$ et $E_{\text{vib.}}$ correspondants, on obtient dans tous les cas un vaste ensemble de transitions possibles (fig. 9.1). Comme les polarités des liaisons sont perturbées ces spectres ont reçu le nom générique imagé de *spectres de transfert de charge*.

$$\Delta E_{\text{tot.}} = \Delta E_{\text{rot.}} + \Delta E_{\text{vib.}} + \Delta E_{\text{élec.}} \quad (9.1)$$

(avec $\Delta E_{\text{élec.}} > \Delta E_{\text{vib.}} > \Delta E_{\text{rot.}}$)

■ Tout spectre réel correspond à un nombre immense de molécules ou autres espèces individuelles qui ne sont pas toutes dans un même état d'énergie. Le graphe résultant correspond donc à une courbe qui enveloppe l'ensemble des transitions individuelles des espèces présentes.

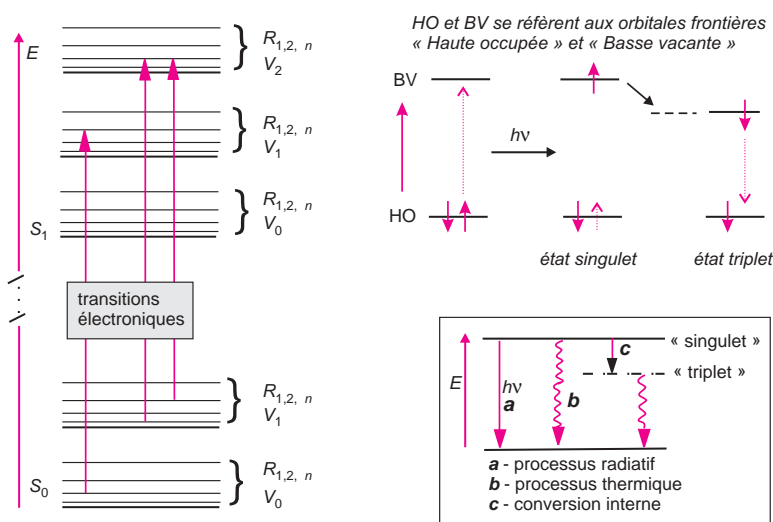


Figure 9.1 Quantification de l'énergie d'une molécule.

Sous la forme d'un diagramme d'état sont réunis les niveaux de rotation, de vibration et électronique d'une même molécule. Chaque trait horizontal correspond à un niveau d'énergie de la molécule. La structure hiérarchique est la suivante : à chaque état électronique S correspond plusieurs états de vibration V qui eux-mêmes comportent plusieurs états de rotation R . À l'échelle de ce dessin, les niveaux de vibration et de rotation devraient être comparativement plus resserrés, les distances étant, environ, entre elles comme les nombres 1 000 :50 :1. Dans les phases condensées, par suite des interactions de proximité d'une molécule à une autre, aucun appareil, aussi bonne que soit sa résolution, ne peut conduire à un spectre faisant apparaître les transitions individuelles. À droite, représentation sous forme d'un diagramme énergétique, de l'absorption d'un photon. Transfert d'un électron d'une orbitale occupée (HO) à une orbitale vacante (BV) avec apparition d'un état singulet évoluant en un état triplet, plus stable. Processus de retour à l'état fondamental d'une espèce excitée. Les transitions étant pratiquement instantanées, la distance entre les atomes n'a pas eu le temps de changer (*Principe de Franck-Condon*).

■ L'énergie captée au cours de l'absorption du photon peut-être restituée par divers processus qui se font avec émission de photons (fig. 9.1c). La *phosphorescence* et la *fluorescence* sont des transformations de ce type exploitées dans d'autres méthodes d'analyse (cf. chapitre 11).

9.2 LE SPECTRE UV-VIS

Les spectromètres UV/Visible permettent d'obtenir le spectre des composés examinés sous la forme d'un tracé de la transmittance, ou de l'absorbance (voir définitions ci-après), en fonction des longueurs d'onde repérées en abscisses, ici en nanomètres (fig. 9.2).

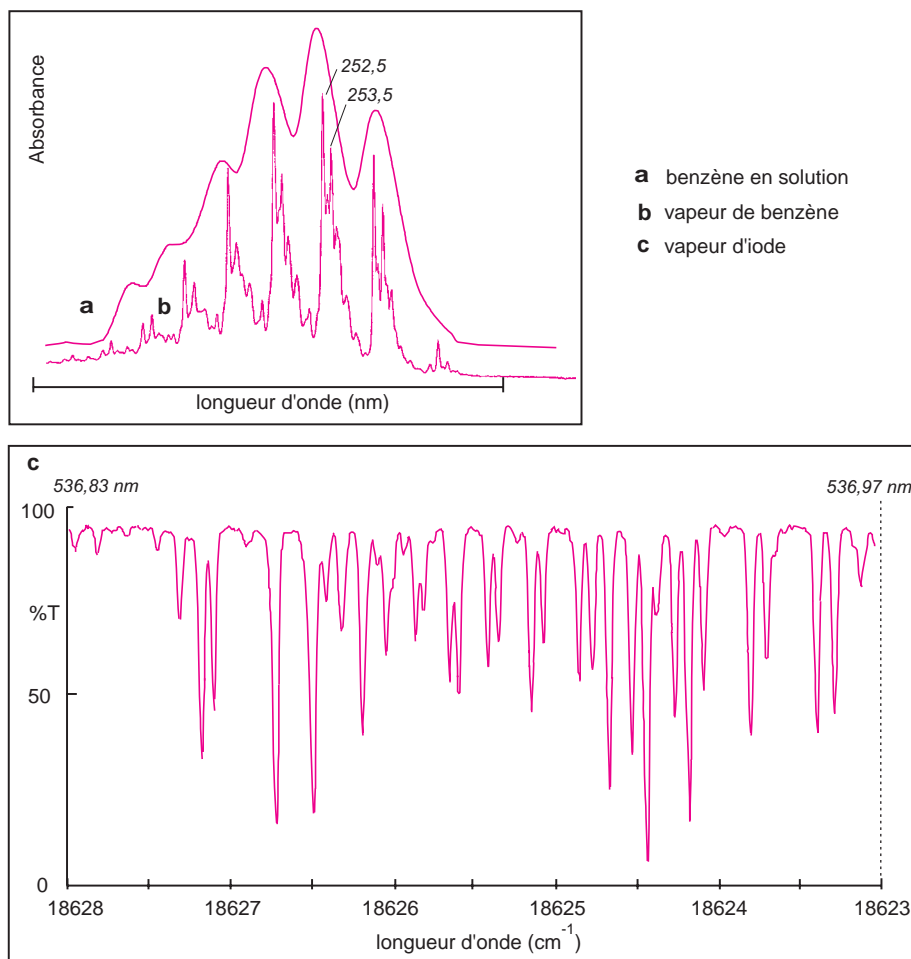


Figure 9.2 Trois aspects différents des spectres rencontrés dans l'UV/Visible. Spectres du benzène a) en solution (spectre de bandes) ; b) à l'état de vapeur (spectre présentant une structure fine) ; c) expansion d'une partie du spectre de la vapeur d'iode haute résolution (0,14 nm d'intervalle au total).

En optique, la *transmittance* T est une mesure de l'atténuation d'un faisceau lumineux monochromatique basée sur la comparaison entre l'intensité lumineuse transmise (I) et l'intensité incidente (I_0) selon que l'échantillon est placé ou non sur le trajet optique entre la source et le détecteur. T est exprimée par un nombre fractionnaire ou sous forme de pourcentage :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \text{ou} \quad \%T = \frac{I}{I_0} \times 100 \quad (9.2)$$

L'absorbance est la grandeur définie par : $A = -\log T$ (9.3)

Les spectres des composés pris en phase condensée, purs ou en solution, présentent généralement des bandes d'absorption larges et peu nombreuses. Mais les spectres obtenus à partir d'échantillons à l'état gazeux et sous faible pression font apparaître une « structure fine » (fig. 9.2). Pour les composés dont la composition atomique est particulièrement simple, les transitions fondamentales apparaissent isolément si le spectromètre possède une très grande résolution. Dans ces situations extrêmes, les positions des absorptions sont repérées en cm^{-1} , unité mieux adaptée que le nm (le calcul montre, par ex., qu'il y a 110 cm^{-1} entre 300 et 301 nm).

9.3 TRANSITIONS ÉLECTRONIQUES DES COMPOSÉS ORGANIQUES

Les composés de la chimie organique forment l'essentiel des études faites en UV/visible. Les transitions observées ont pour origine les électrons des liaisons σ ou π et les doublets non-liants n des atomes tels H, C, N, O. Chaque fois qu'il en est possible, on indique pour toute bande d'absorption sa nature en relation avec les orbitales moléculaires (OM) concernées et le coefficient d'absorption molaire ε ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) calculé au maximum de la bande d'absorption.

9.3.1 Transition $\sigma \rightarrow \sigma^*$

Elle apparaît dans le lointain UV car le saut d'un électron d'une OM liante σ dans une OM antiliante σ^* demande beaucoup d'énergie. C'est pourquoi les hydrocarbures saturés qui ne présentent que des liaisons de ce type, sont transparents dans le proche UV (fig. 11.4).

Exemple : *hexane* (à l'état gazeux) : $\lambda_{\text{max}} = 135 \text{ nm}$ ($\varepsilon = 10\,000$).

■ Le cyclohexane et l'heptane sont utilisés comme solvants dans le proche UV. À 200 nm l'absorbance A d'une épaisseur de 1 cm d'heptane est égale à 1. Malheureusement, le pouvoir de solvation de ces solvants est insuffisant pour dissoudre de nombreux composés polaires.

De même, la transparence de l'eau dans le proche UV ($A = 0,01$ pour $\ell = 1 \text{ cm}$, à $\lambda = 190 \text{ nm}$) est due au fait qu'il ne peut y avoir que des transitions $\sigma \rightarrow \sigma^*$ et $n \rightarrow \sigma^*$.

9.3.2 Transition $n \rightarrow \sigma^*$

Le saut d'un électron d'un doublet n des atomes O, N, S, Cl.. dans une OM σ^* conduit à une transition d'intensité moyenne qui se situe vers 180 nm pour les alcools, vers 190 nm pour les éthers ou les dérivés halogénés et vers 220 nm pour les amines (fig. 9.3).

Exemples : *méthanol* : $\lambda_{\text{max}} = 183 \text{ nm}$ ($\varepsilon = 50$); *éther* : $\lambda_{\text{max}} = 190 \text{ nm}$ ($\varepsilon = 2\,000$)

éthylamine : $\lambda_{\text{max}} = 210 \text{ nm}$ ($\varepsilon = 800$); *chloro-1-butane* : $\lambda_{\text{max}} = 179 \text{ nm}$.

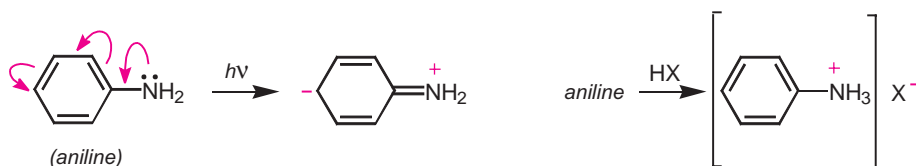


Figure 9.3 Transition $n \rightarrow \sigma^*$ de l'aniline (une amine primaire).

La transition correspond à une augmentation du « poids » de la forme mésomère polaire. L'absorption de l'aniline correspondant à cette transition disparaît si on ajoute un équivalent d'un acide protonique type HX, par suite de la formation d'un sel d'ammonium qui mobilise le doublet libre de l'atome d'azote, nécessaire à cette transition (voir la formule entre crochets).

9.3.3 Transition $n \rightarrow \pi^*$

Cette transition peu intense résulte du passage d'un électron d'une OM non liante de type n à une OM antiliante π^* . On la rencontre pour les molécules comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres et appartenant à un système insaturé. La plus connue est celle qui correspond à la bande carbonyle, facilement observable, située entre 270 et 295 nm. Le coefficient d'absorption molaire est faible.

Exemple : *éthanal* : $\lambda = 293$ nm ($\epsilon = 12$, dans l'éthanol comme solvant).

9.3.4 Transition $\pi \rightarrow \pi^*$

Les composés qui possèdent une double liaison éthylénique isolée conduisent à une forte bande d'absorption vers 170 nm, dont la position dépend de la présence de substituants hétéroatomiques.

Exemple : *éthylène* : $\lambda_{\max} = 165$ nm ($\epsilon = 16\,000$).

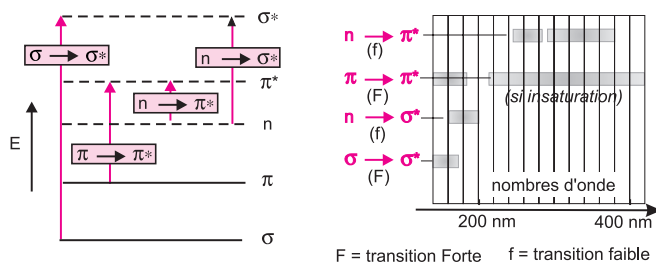


Figure 9.4 Comparatif des transitions les plus souvent rencontrées dans les composés organiques simples.

Les quatre types de transitions sont réunies sur un unique diagramme énergétique pour les situer les unes par rapport aux autres dans le cas général et pour préciser les plages spectrales concernées.

■ Un composé transparent dans un domaine spectral, lorsqu'il est pris à l'état isolé, peut devenir absorbant s'il est mis en présence d'une espèce avec laquelle il interagit par un mécanisme du type *donneur-accepteur* (D-A). Ce phénomène est lié au passage d'un électron appartenant à une orbitale liante du donneur (qui devient un cation radicalaire) vers une orbitale vacante de l'accepteur (devenu un anion radicalaire) de niveau énergétique proche

(fig. 9.5). La position de la bande d'absorption sur le spectre est fonction du *potentiel d'ionisation* du donneur et de l'*affinité électronique* de l'accepteur ; la valeur de ε est en général très grande.

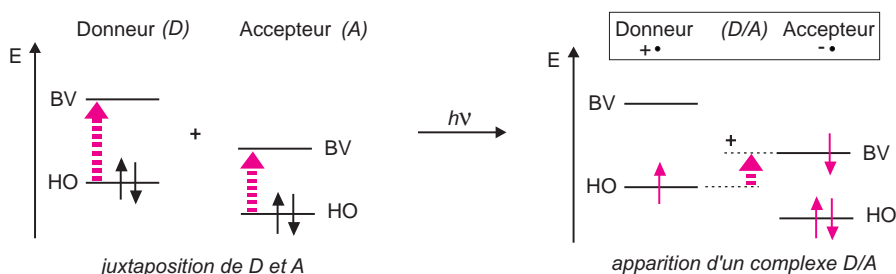


Figure 9.5 Représentation énergétique d'une interaction donneur/accepteur. L'état excité est supposé être essentiellement sous forme ionique.

■ **Transition $d \rightarrow d$.** De nombreux sels inorganiques, comportant des électrons engagés dans des orbitales moléculaires **d**, conduisent à des transitions de faible absorptivité situées dans le domaine visible, responsables de colorations. Ainsi les solutions des sels métalliques de titane $[\text{Ti}(\text{H}_2\text{O})_6]^{+++}$ ou de cuivre $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_6]^{++}$ sont bleues, le permanganate de potassium donne des solutions violettes, etc..

9.4 GROUPEMENTS CHROMOPHORES

Les groupes fonctionnels des composés organiques (cétones, amines, dérivés nitrés, etc.) responsables de l'absorption en UV/VIS sont appelés *groupements chromophores* (tab. 9.1). Une espèce formée d'un squelette carboné transparent dans le proche UV et porteur d'un ou de plusieurs chromophores constitue un chromogène.

Tableau 9.1 Chromophores caractéristiques de quelques groupements azotés.

Nom	Chromophore	λ_{max} (nm)	ε_{max} ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
amine	$-\text{NH}_2$	195	3 000
oxime	$=\text{NOH}$	190	5 000
nitro	$-\text{NO}_2$	210	3 000
nitrite	$-\text{ONO}$	230	1 500
nitrate	$-\text{ONO}_2$	270	12
nitroso	$-\text{N}=\text{O}$	300	100

➤ **Chromophores isolés** : pour une série de molécules possédant le même chromophore, la position et l'intensité des bandes d'absorption restent sensiblement constantes. Si une molécule possède plusieurs chromophores isolés, c'est-à-dire n'interagissant pas l'un sur l'autre parce que séparés par au moins deux liaisons simples, on observe la superposition des effets de chacun des chromophores individuels.

- **Chromophores des systèmes conjugués** : quand les chromophores interagissent l'un sur l'autre, le spectre d'absorption est déplacé vers les grandes longueurs d'onde (*effet bathochrome*) avec augmentation de l'intensité d'absorption (*effet hyperchrome*). Un cas particulier est celui des systèmes conjugués, c'est-à-dire des structures organiques comportant plusieurs chromophores insaturés séparés entre eux par une liaison simple. Le spectre est alors fortement perturbé par rapport à la simple superposition des effets produits par les chromophores isolés. Plus le nombre d'atomes de carbone, sur lequel le système conjugué s'étend est élevé, plus l'écart entre le niveau des orbitales frontière diminue (tab. 9.2). Cela se traduit par un effet bathochrome très important (fig. 9.6).

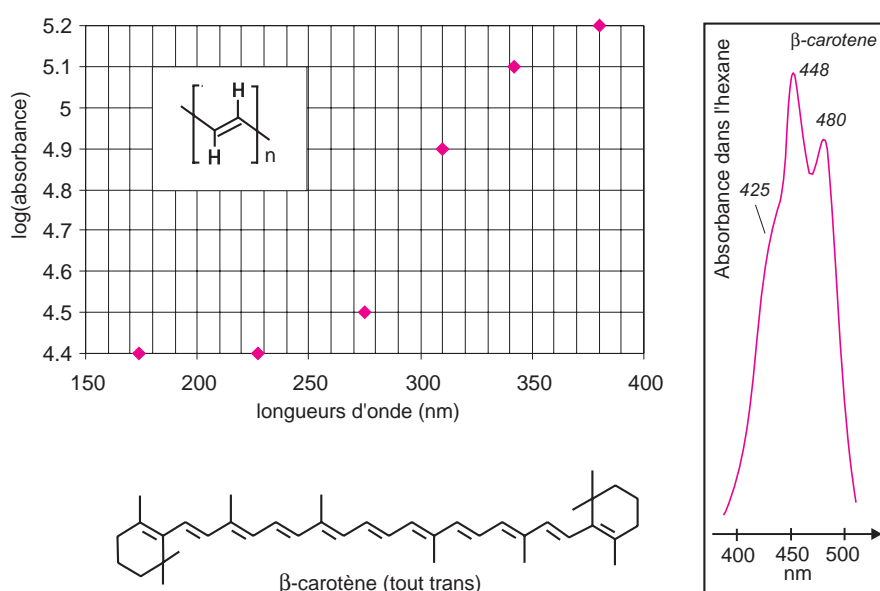


Figure 9.6 Effet de plusieurs doubles liaisons conjuguées sur la position du maximum d'absorption de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ pour quelques polyènes conjugués.

Valeurs des λ_{\max} d'une famille de polyènes *E*-disubstitués conjugués qui diffèrent entre eux par le nombre de doubles liaisons conjuguées. Cet effet est à l'origine de la couleur de nombreux composés naturels dont les formules semi-développées présentent des chromophores conjugués étendus. Ainsi la couleur orangée du β -carotène « tout trans » ci-dessus, provient de la présence de onze doubles liaisons conjuguées ($\lambda_{\max} = 425, 448, \text{ et } 475 \text{ nm}$ dans l'hexane). Plus la délocalisation des électrons est importante, plus grand est l'effet bathochrome. Spectres d'un éthylénique simple et d'un composé présentant deux doubles liaisons conjuguées. Les composés aromatiques conduisent à des spectres plus complexes que les éthyléniques. Les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ sont à l'origine d'une « structure fine ». Le spectre de la vapeur de benzène, obtenu à partir d'une goutte déposée au fond d'une cuve en verre de silice de 1 cm de trajet optique, est un excellent test pour évaluer la résolution des appareils du proche UV (fig. 9.1). La substitution du noyau modifie, de façon très importante, l'aspect des bandes d'absorption.

9.5 EFFETS DUS AUX SOLVANTS : SOLVATOCHROMIE

Chaque solvant a une polarité qui lui est propre. Comme on sait que toute transition électronique modifie la répartition de la charge dans le composé en solution, il est évident que la position et l'intensité des bandes d'absorption vont varier quelque peu avec la nature du solvant employé. Les interactions solvant/soluté sont suffisamment nettes pour reconnaître à quel type de transition électronique on est en présence. On distingue deux effets opposés.

9.5.1 Effet hypsochrome (*blue shift*)

Si le chromophore responsable de la transition observée est plus polaire dans son état fondamental que dans son état excité, un solvant polaire stabilisera surtout la forme avant absorption du photon par solvation. Il faudra donc plus d'énergie pour provoquer la transition électronique concernée, d'où un déplacement du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'onde comparativement à ce qui se passerait dans un solvant non polaire. C'est l'*effet hypsochrome*.

Il en est ainsi pour la transition $n \rightarrow \pi^*$ du carbonyle des cétones en solution. La forme C^+-O^- (caractérisée par son moment dipolaire μ) sera d'autant plus stabilisée que le solvant sera plus polaire. L'état excité étant atteint rapidement, la cage de solvant, qui entoure le carbonyle, n'a pas le temps de se réorienter pour stabiliser la situation après absorption du photon. Ce même effet s'observe pour la transition $n \rightarrow \sigma^*$. Il est accompagné d'une variation du coefficient ϵ .

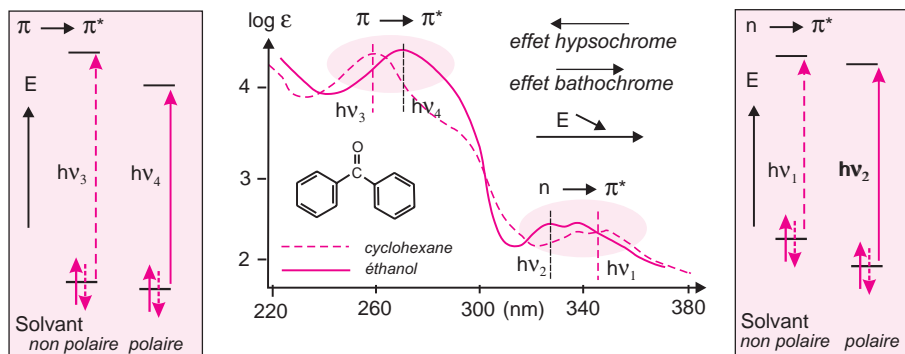


Figure 9.7 Spectres de la benzophénone dans le cyclohexane (1) et dans l'éthanol (2).

On observe ici avec deux solvants différents les effets bathochrome ou hypsochrome, sur les deux types de transitions.

9.5.2 Effet bathochrome (*red shift*)

Pour les composés peu polaires l'effet de solvant est faible. Cependant si le moment dipolaire du chromophore augmente au cours de la transition, l'état final sera plus solvato. Un solvant polaire va ainsi stabiliser la forme excitée, ce qui favorise la transition : on observe un déplacement vers les grandes longueurs d'onde, comparativement au spectre obtenu dans un solvant non polaire. C'est l'*effet bathochrome*. Il en est ainsi de la transition $\pi \rightarrow \pi^*$ des hydrocarbures éthyléniques dont la double liaison de départ est peu polaire.

9.5.3 Effet du pH

Le pH du milieu dans lequel est dissous l'analyte peut avoir un effet important sur le spectre. Parmi les composés qui manifestent cet effet de manière spectaculaire, on trouve les indicateurs colorés dont le changement de couleur est mis à profit au cours de dosages acidimétriques (fig. 9.8). C'est ainsi qu'on peut repérer les points d'équivalence.

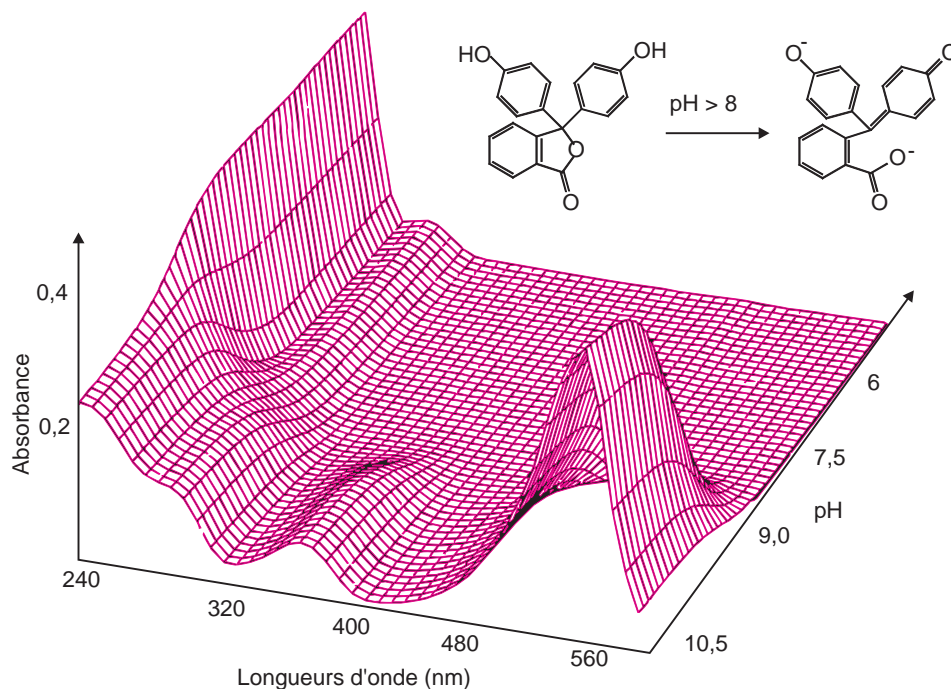


Figure 9.8 Effet du pH sur une solution de phénolphthaléine.

Ce composé est incolore pour des pH inférieurs à 8 et rose vif pour des pH supérieurs à 9,5. Le graphe présenté ici en perspective montre bien que pour des pH acides il n'y a pas d'absorption dans la partie visible du spectre. En revanche, c'est l'absorption vers 500 nm qui apparaît quand le pH devient alcalin, qui est responsable de la couleur bien connue de ce composé. On notera pour cet exemple, la modification des liaisons chimiques selon le pH.

9.6 RÈGLES DE WOODWARD-FIESER

L'analyse structurale à partir des spectres électroniques est assez problématique, dans la mesure où leur relative simplicité a pour corollaire un faible apport d'informations. Il y a une soixantaine d'années cependant, avant l'arrivée des techniques plus puissantes d'identification que nous connaissons maintenant, la spectrométrie UV/Visible a été utilisée dans ce but. L'étude des spectres d'un grand nombre de molécules a permis d'établir des corrélations entre structures et positions des maxima d'absorption. Les plus connues sont les règles empiriques, dues à Woodward, à Fieser et à Scott, qui concernent les composés carbonylés insaturés, les diènes ou les stéroïdes. À partir de tableaux rassemblant, sous forme d'incrément, divers facteurs et particularités de structure, on peut prévoir la position de la bande

d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ de ces systèmes conjugués particuliers (tab. 9.2). La concordance est bonne entre les valeurs calculées et les positions expérimentales comme en témoignent les quatre exemples de la figure 9.9.

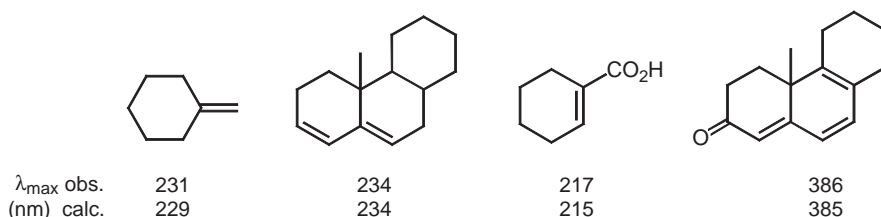
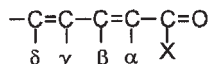


Figure 9.9 Correspondance entre les valeurs calculées et expérimentales pour quelques composés organiques présentant des insaturations.

Les calculs sont faits à partir des valeurs du tableau 9.2.

Tableau 9.2 Table de corrélation en spectrométrie UV/visible. Règles de Woodward-Fieser-Scott pour le calcul de la position du maximum d'absorption des énones et diénones (précision 3 nm).

type de structure concernée



solvant : méthanol ou éthanol


incréments

chaque double liaison conjuguée additionnelle	30 nm
caractère exocyclique d'une double liaison C=C	5 nm
caractère homoannulaire diénique	39 nm
pour chaque substituant, ajouter (en nm) :	

incrément de solvant

eau	+ 8 nm
chloroforme	- 1 nm
éther	- 7 nm
cyclohexane	- 11 nm

structure de base

	X = H	207 nm
	X = Alkyle	215 nm*
	X = OH, O-Alkyle	193 nm

chaîne ouverte ou cycle à 6 C
(cycle à 5 C : 202 nm)

positions	α	β	γ	δ
Alkyle	10	12	18	18
-Cl	15	12		
-Br	25	30		
-OH	35	30		50
-O-Alkyle	35	30	17	31
-O-Acyle	6	6	6	6
-N(R) ₂		95		

9.7 INSTRUMENTATION DANS L'UV/VISIBLE

Un spectrophotomètre est conçu autour de trois modules : ceux de la *source* et du *système dispersif* (souvent conçu comme un monochromateur), qui constituent la partie optique et celui qui est responsable de la détection (fig. 9.10). L'ensemble est réuni dans un bâti unique. Un compartiment échantillon est inséré sur le trajet optique après ou avant le système dispersif selon la conception du montage.

Certains spectromètres sont réservés aux analyses de routine pour lesquelles il n'est pas besoin d'avoir une résolution élevée, sachant qu'en solution la plupart des composés conduisent à des spectres dépourvus de bandes fines. Il est essentiel, en revanche, que ces instruments conduisent à des mesures d'absorbance précises sur une gamme étendue de concentrations.

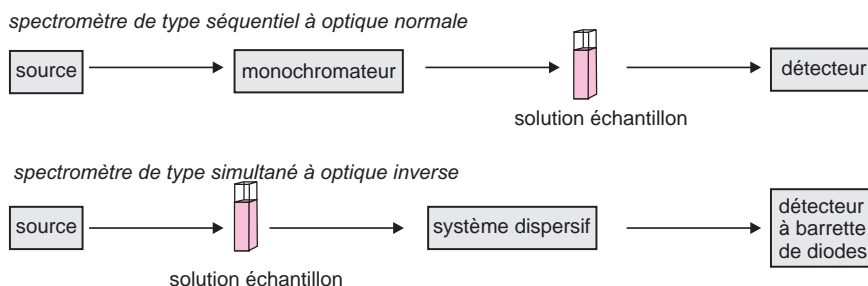


Figure 9.10 Instrumentation dans l'UV/Visible.

Deux approches différentes permettent d'aboutir au spectre. Dans la première le spectre est obtenu de manière séquentielle en fonction du temps (une seule longueur d'onde à la fois). Dans la seconde, le détecteur « voit » toutes les longueurs d'onde simultanément. Ce dernier type d'analyseurs correspond à une simplification notable des spectromètres séquentiels.

9.7.1 Sources lumineuses

On ne connaît pas de source lumineuse continue pouvant couvrir efficacement la totalité de la gamme spectrale concernée. C'est la raison pour laquelle beaucoup de spectromètres comportent deux lampes à usage de sources, l'une pour la partie du proche UV et l'autre pour la partie s'étendant vers le visible (fig. 9.11). On trouve généralement réunies :

- Une *lampe à arc au deutérium* sous moyenne pression pour la partie UV (< 350 nm).
- Une *lampe à incandescence* avec un filament de tungstène et une enveloppe de verre de silice (quartz) pour la partie visible du spectre et au-delà (à partir de 350 nm). Elle contient une petite quantité d'iode, pour augmenter sa durée (lampe QTH). Cette source est maintenant souvent remplacée par une *lampe à arc xénon*, plus énergétique et qui de ce fait est choisie comme source unique par les constructeurs lorsqu'il s'agit d'un appareil de routine allant de 300 à 1 100 nm.

■ La source à deutérium comporte deux électrodes qui baignent dans une atmosphère de ce gaz (D_2 est préféré au dihydrogène H_2 , pour des raisons techniques) entre lesquelles est placé un écran métallique percé d'un trou circulaire d'environ 1 mm (fig. 9.11). La circulation des électrons vers l'anode crée un courant de décharge qui provoque un arc intense au niveau de l'orifice situé près de l'anode. Soumises à ce bombardement d'électrons, les molécules de dideutérium D_2 se dissocient avec émission de photons qui forment un continuum d'émission dont les longueurs d'onde s'étendent de 160 à 500 nm.

9.7.2 Systèmes dispersifs

- *Appareils séquentiels.* Les radiations émises par la source sont dispersées par un réseau plan ou concave qui fait partie d'un montage appelé monochromateur. Ce dispositif permet d'extraire de la lumière émise par la source, un domaine étroit de son spectre d'émission. La longueur d'onde, ou plus exactement la largeur de la bande spectrale qui est fonction de la *largeur de fente*, varie graduellement au cours du temps par pivotement du réseau (fig. 9.12). Les meilleures résolutions sont obtenues avec des montages comportant des monochromateurs de grandes distances focales (0,2 à 0,5 m).

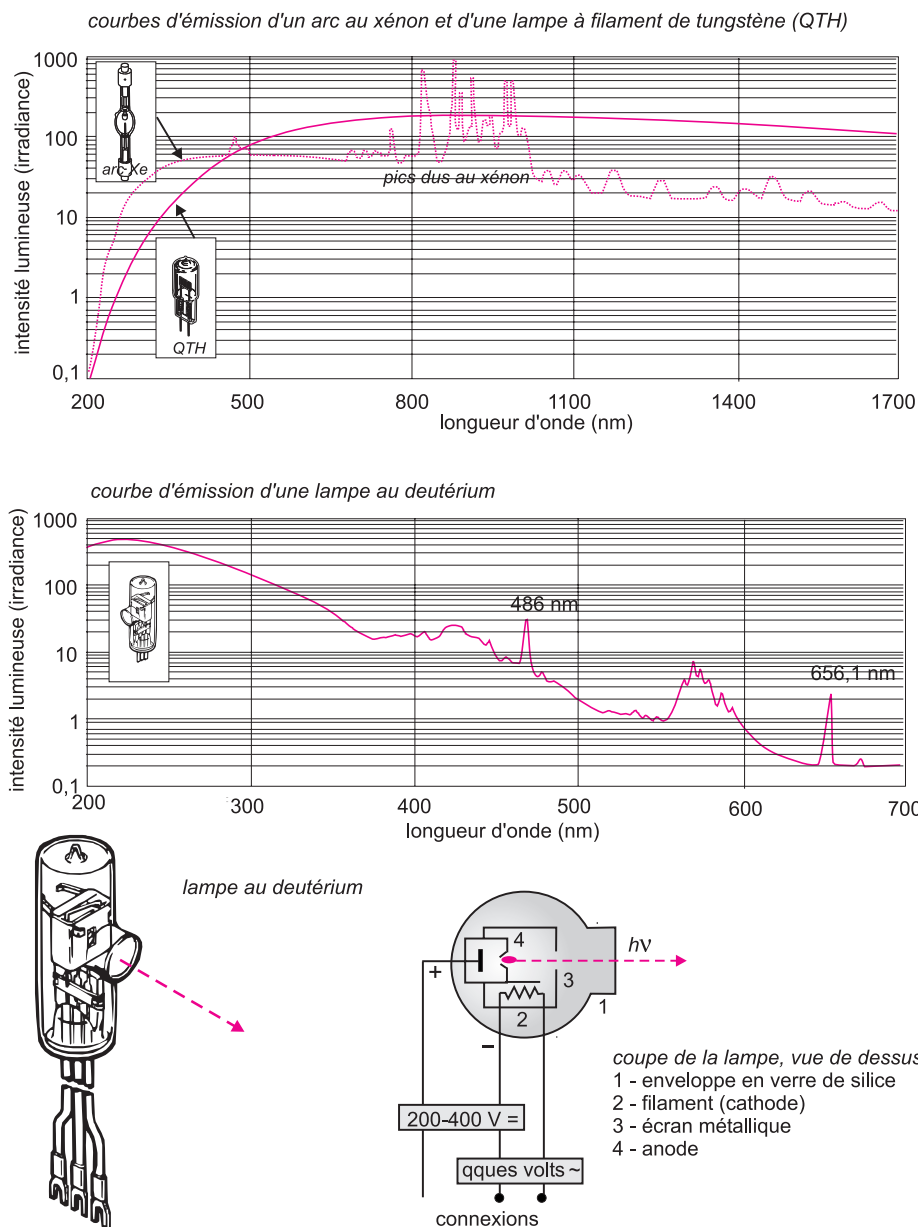


Figure 9.11 Spectres d'émission de différents types de sources dans l'UV-Visible.

L'échelle logarithmique rend compte des grandes différences d'intensité lumineuse selon les longueurs d'onde, pour les lampes sans filament. Vue générale et vue de dessus d'une lampe à deutérium (reproduit avec l'autorisation de la société Oriol). La lampe est amorcée avec une tension de 3 à 400 V. L'anode est une plaque de molybdène et la cathode est un filament d'oxydes métalliques émetteur d'électrons, alimenté sous quelques volts. Les pics d'émission du deutérium à 486,0 et 656,1 nm sont souvent utilisés pour régler les échelles de longueur d'onde des spectromètres.

► **Appareils simultanés.** Cette catégorie d'appareils comporte simplement un réseau situé après le compartiment échantillon pour diffracter les radiations transmises. Ils fonctionnent suivant le principe des spectrographes (fig. 9.10).

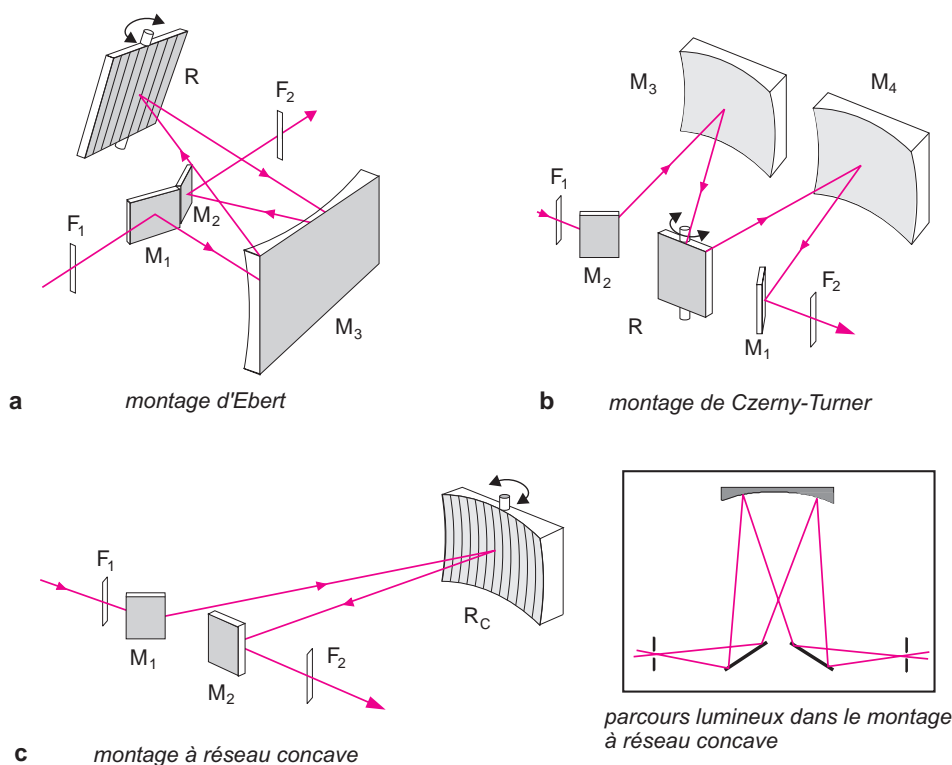


Figure 9.12 Monochromateurs à réseau.

a) Montage d'Ebert comportant un seul miroir sphérique concave M_3 . Il donne une excellente qualité d'image en compensant les aberrations ; b) montage Czerny-Turner, de conception voisine, comportant deux miroirs sphériques M_3 et M_4 ; c) montage avec un réseau concave R_C permettant à la fois dispersion et focalisation du rayonnement. Ces trois monochromateurs sont représentés en configuration latérale. La bande spectrale passante des monochromateurs dépend des largeurs des fentes d'entrée F_1 et de sortie F_2 .

9.7.3 Détecteurs

Le détecteur convertit en un signal électrique l'intensité de la radiation lumineuse qui l'atteint. Sa sensibilité dépend de la longueur d'onde. On utilise soit un tube photomultiplicateur soit un semi-conducteur (détecteur à transfert de charge ou photodiode au silicium).

Pour les appareils dits « simultanés » qui ne possèdent pas de monochromateur mais un système dispersif, on mesure les intensités lumineuses à toutes les longueurs d'onde pratiquement au même instant en alignant un grand nombre de détecteurs quasi ponctuels pour former une *barrette de diodes* (fig. 9.13). Le seuil photoélectrique, de l'ordre de 1 eV, permet de prolonger la plage de détection jusqu'à 1,1 μm .

■ L'efficacité d'un tube photomultiplicateur — dispositif très sensible dont la linéarité de la réponse s'étend sur 7 décades — dépend du rendement de la photocathode, qui varie avec la longueur d'onde (par ex. 0,1 e^- /photon à 750 nm), et de l'amplification du signal procuré par la cascade de dynodes (par exemple gain de 6×10^5). Avec ces valeurs, l'impact de 10 000 photons/s produit un courant de 0,1 nA. Il est difficile pour un photomultiplicateur,

comme cela le serait pour l'œil, de comparer avec précision deux intensités lumineuses, en provenance pour l'une, du faisceau de référence et pour l'autre, du faisceau échantillon, lorsqu'elles sont très différentes. C'est pourquoi il est préférable que l'absorbance des solutions ne dépasse pas 1 (voir également § 9.15). Avec un instrument dont la lumière parasite est de 0,01 % (mesurée en % de transmittance), l'augmentation de la concentration de la solution ne produira plus de variations significatives du signal au delà de 4 unités d'absorbance.

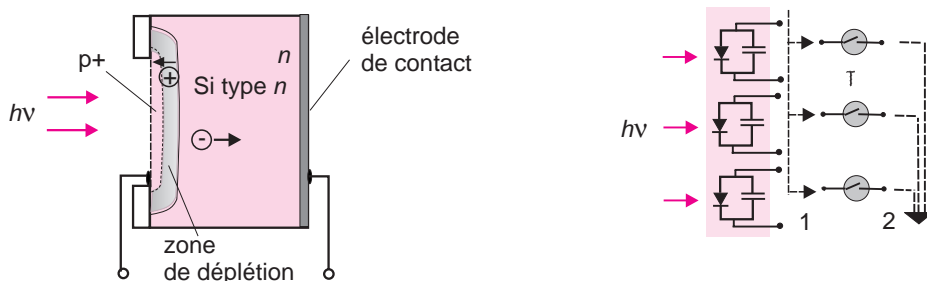


Figure 9.13 Photodiode au silicium et barrette de diodes (détecteurs CCD - charged coupled device).

Chaque diode, de forme rectangulaire ($15 \times 25 \mu\text{m}$), est associée à un condensateur préalablement chargé. Sous l'impact des photons la diode devient conductrice et décharge donc progressivement le condensateur. La valeur de la charge résiduelle de chacun des condensateurs dépend du nombre de photons reçus. Elle est mesurée de façon séquentielle par le circuit électronique (1 et 2). Les condensateurs sont rechargés périodiquement. À la différence du photomultiplicateur qui donne une intensité instantanée en watts, la diode permet de connaître l'énergie émise pendant un intervalle de temps en joules. La sensibilité, la linéarité et la gamme dynamique de réponse sont excellentes.

9.8 LES DIFFÉRENTES CONFIGURATIONS DES SPECTROMÈTRES UV/VIS

9.8.1 Spectromètres à optique monofaisceau, de type monocal

Beaucoup de dosages de routine sont effectués à longueur d'onde fixe avec des photomètres simples munis de filtres interférentiels interchangeables ou de monochromateurs simples. La mesure de transmittance (ou d'absorbance) exige de comparer à la même longueur d'onde le signal de la source avant et après traversée de la solution échantillon. On place donc successivement sur le trajet optique un témoin correspondant au solvant seul ou une solution contenant les réactifs du dosage (mais sans le composé à doser, c'est le *blanc analytique*), puis la solution préparée à partir de l'échantillon de concentration inconnue. Ces appareils peuvent disposer d'une compensation électronique des variations d'intensité de la source (fig. 9.14) connue sous le nom de *split-beam*. Une partie de la lumière est déviée avant qu'elle n'atteigne l'échantillon, ce qui permet de stabiliser l'intensité de la source (il ne s'agit pas à proprement parler d'un faisceau de référence). Ces appareils donnent l'absorbance et calculent le plus souvent la concentration cherchée.

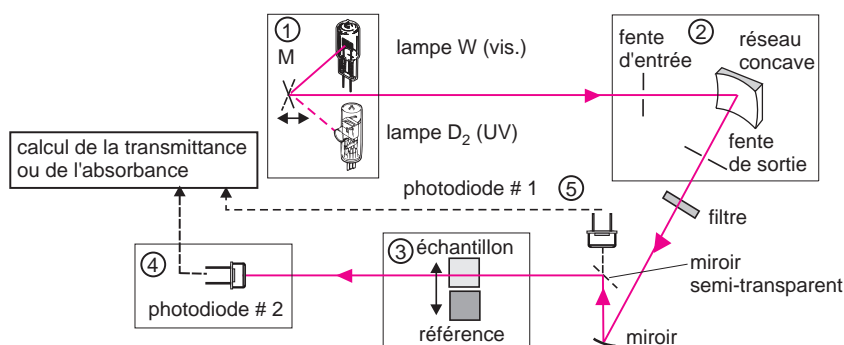


Figure 9.14 Schéma optique simplifié d'un spectrophotomètre simple faisceau de mode séquentiel.

1 : Deux sources coexistent mais une seule est choisie en fonction de la mesure. 2 : le monochromateur sélectionne la longueur d'onde de mesure. 3 : compartiment de mesure où une cellule contenant soit l'échantillon soit un blanc est placée sur le trajet optique. 4-5 : diode détectrice et diode de contrôle.

9.8.2 Appareils à optique inversée, de type multicanaux

Ce type d'appareil est apparenté aux spectrographes dans la mesure où il permet l'observation instantanée de toute l'étendue du spectre par emploi d'un détecteur composé d'un alignement de photodiodes miniaturisées, dont le nombre peut atteindre 2 000 (fig. 9.15). Un tel détecteur réalise une exploration séquentielle très rapide, considérée comme *quasi-simultanée*, de toute une gamme spectrale en $1/10^6$ de seconde, en consultant les signaux envoyés par les diodes dont chacune est dévolue à un petit intervalle de longueur d'onde. Le pouvoir de résolution de ces appareils sans monochromateur (donc plus lumineux) est limité par la taille des diodes.

9.8.3 Spectromètres à optique double faisceau (type séquentiel)

Les meilleurs spectrophotomètres dans ce domaine restent encore les appareils à deux faisceaux dont l'un traverse l'échantillon et l'autre sert de parcours de référence. Deux miroirs tournants en forme de secteurs, synchronisés avec le mouvement *pas à pas* du réseau, permettent au détecteur de comparer exactement pour la même longueur d'onde les intensités transmises par l'une ou l'autre des deux voies (fig. 9.16). L'amplification du seul signal modulé permet d'éliminer en partie la lumière parasite. Le circuit ajuste la sensibilité du photomultiplicateur de façon inverse à l'intensité lumineuse qu'il reçoit. Un montage plus simple consiste à utiliser un miroir semi-transparent et deux photodiodes appariées. Le signal correspond à la tension nécessaire pour maintenir invariable la réponse du détecteur (principe de rétroaction ou *feed-back*). Ces appareils se caractérisent par une vitesse de balayage rapide (30 nm/s) et la possibilité de mesurer des absorbances de plusieurs unités.

■ Pour vérifier l'exactitude des longueurs d'onde des spectromètres, on utilise une solution à 4 % m/v d'oxyde d'holmium dans l'acide perchlorique 10 % v/v , dont on connaît la position précise des différents maxima du spectre. Les valeurs dépendent quelque peu du réglage de la largeur de bande spectrale. En effet les bandes d'absorption ne sont pas symétriques si bien que la largeur de la bande spectrale choisie pour le balayage du spectre influe sur

l'énergie qui vient frapper à chaque instant le détecteur, ce qui se répercute sur l'intensité du signal, et finalement sur le tracé du spectre. Ex : en passant d'une largeur de fente de 0,1 nm à 3 nm, le maximum d'absorption à 536,47 nm passe à 537,50 nm.

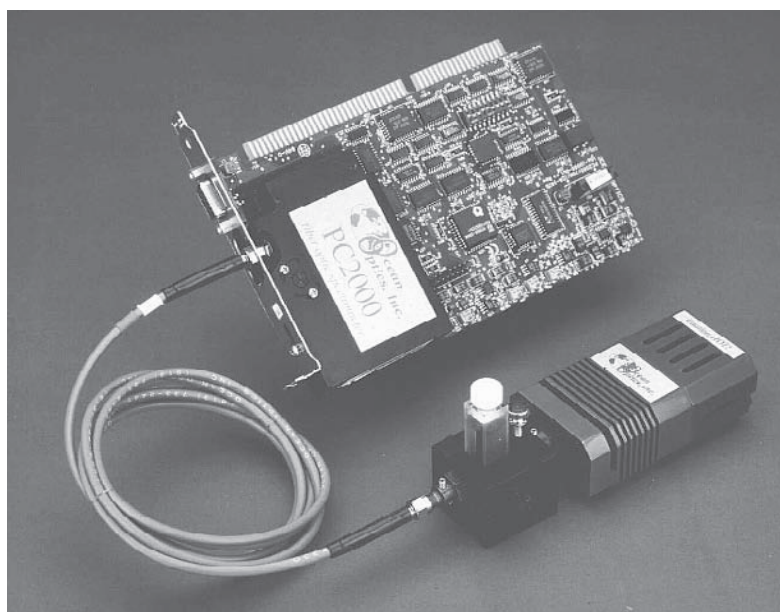
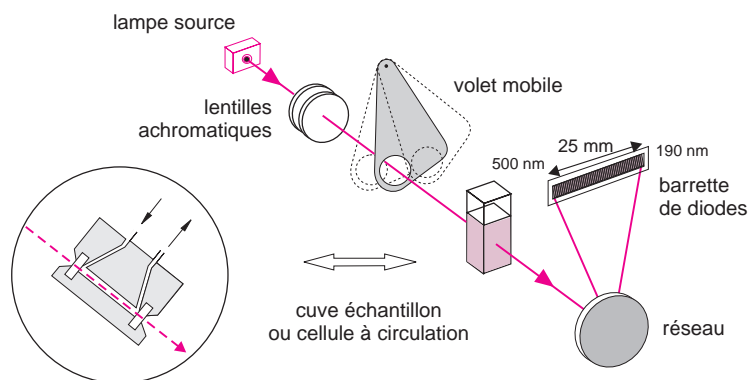


Figure 9.15 Schéma optique d'un spectrophotomètre simple faisceau illustrant le mode simultané (spectromètre à barrette de diodes).

Le volet, seule pièce mobile, permet de soustraire le bruit de fond ou « courant d'obscurité » produit lorsque aucune lumière ne vient frapper les diodes. Le montage à optique inversée permet de travailler avec le compartiment échantillon ouvert à la lumière extérieure. Ces appareils sont largement utilisés, comme détecteurs, en chromatographie liquide (cf. 2.7). En bas : exemple de réalisation d'un spectromètre miniaturisé dont le système dispersif et le détecteur sont intégrés sur une carte enfichable dans un micro ordinateur. Une fibre optique transmet la lumière en provenance de la partie source/cellule-échantillon située à distance (reproduit avec l'autorisation de la société Ocean Optics Europe).

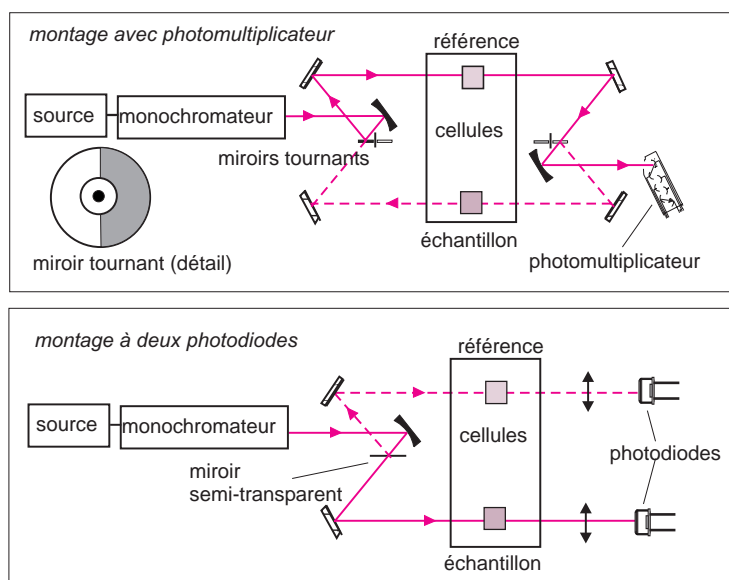


Figure 9.16 Parcours optique de deux appareils à double faisceau, entre la sortie du monochromateur et le détecteur (modèle à miroirs tournants et modèle à miroir semi-transparent). L'agencement des appareils à miroirs tournants est à rapprocher de celui des spectrophotomètres IR, hormis le fait que la lumière issue de la source passe d'abord par le monochromateur avant d'arriver sur l'échantillon. On minimise ainsi les réactions de photolyse qui pourraient survenir par exposition prolongée à la totalité des radiations de la source. L'optique plus compacte des montages à un seul faisceau divisé associé à deux détecteurs est plus simple. Un miroir semi-transparent et fixe remplace le mécanisme délicat des miroirs tournants synchrones.

Les spectrophotomètres à double faisceau permettent de faire des mesures différentielles entre l'échantillon et le blanc analytique. Ils sont préférables aux modèles monofaisceau si les solutions sont troubles. La bande passante des meilleurs appareils peut descendre à 0,01 nm.

Pour permettre des mesures de routine sans avoir à faire de prélèvement, ou pour surveiller la concentration d'un produit sur une ligne de fabrication, à distance du spectrophotomètre, on utilise une sonde à immersion. Il s'agit d'un accessoire placé dans le compartiment échantillon de l'appareil et qui comporte deux fibres optiques pour conduire et récupérer la lumière après absorption dans le milieu étudié. Il en existe deux types : par transmission pour les solutions limpides et par réflexion totale atténuée (ATR) pour les solutions très absorbantes (fig. 9.17).

■ **Les composés fluorescents.** Quand le composé étudié est fluorescent, le spectre d'absorption est moins intense puisque la lumière ré-émise vient se superposer à la lumière absorbée. Observée avec un montage à optique inversée, par exemple, la fluorescence de l'échantillon (soumis à la totalité du rayonnement de la source) diminue donc l'absorbance dans la partie du spectre où se situe l'émission. Par contre, avec un montage optique traditionnel, la fluorescence apparaît quand le monochromateur sélectionne la zone correspondant à l'excitation : l'absorbance sera moins intense dans cette partie du spectre enregistré. Cependant il ne faut pas grossir le problème, car la fluorescence est émise dans toutes les directions et

les photons qui empruntent le trajet optique constituent une très petite partie de la lumière émise.

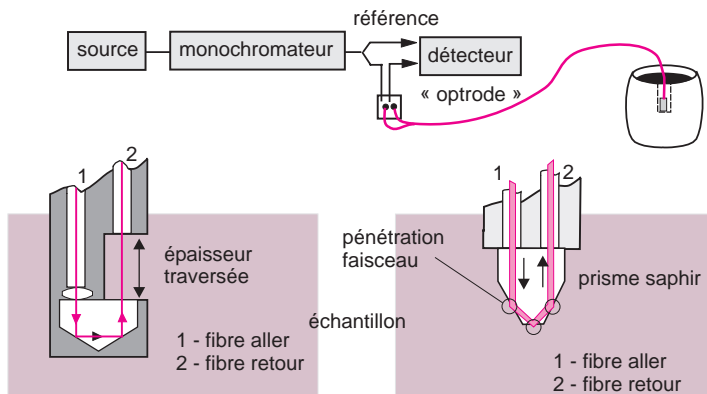


Figure 9.17 Principe d'un spectrophotomètre avec sonde d'immersion.

La lumière monochromatique issue du spectrophotomètre est guidée vers une cellule à immersion puis retourne vers le détecteur. Le trajet de référence est également assuré par une autre fibre optique. À gauche, sonde à transmission. À droite sonde ATR : Le prisme saphir a un indice plus grand que celui de la solution. Le dessin matérialise les trois réflexions du faisceau optique avec pénétration dans la solution (voir explication au § 10.9.3).

9.9 ANALYSE QUANTITATIVE : LOIS DE L'ABSORPTION MOLÉCULAIRE

9.9.1 Loi de Beer et Lambert

L'UV/Visible est largement exploité en analyse quantitative, depuis fort longtemps dans le domaine du visible. Les mesures reposent sur la loi de Beer et Lambert qui relie dans certaines conditions, l'absorption de la lumière à la concentration d'un composé en solution.

L'origine de cette loi remonte aux travaux du mathématicien français Lambert qui avait, au XVIII^e siècle, défini les bases de la photométrie. Par la suite Beer, physicien allemand du XIX^e siècle, a posé une loi qui permet de calculer la quantité de lumière transmise après passage à travers une épaisseur donnée d'un composé en solution dans une matrice non absorbante.

Il en est résulté la *loi de Beer et Lambert* présentée ici sous sa forme actuelle :

$$A = \varepsilon_{\lambda} \ell c \quad (9.4)$$

A désigne l'absorbance, paramètre optique sans dimension, accessible au moyen du spectrophotomètre, ℓ est l'épaisseur (en cm) de la solution traversée, c la concentration molaire et ε_{λ} le coefficient d'absorption molaire ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) à la longueur d'onde λ à laquelle on fait la mesure. Ce coefficient, (également appelé coefficient d'absorbance) propre au composé analysé, dépend en outre de la température et du solvant. Généralement sa valeur est repérée pour la seule longueur d'onde du maximum d'absorption. Elle peut varier sur une large plage allant de quelques unités à plus de 200 000.

À l'origine de cette formule on trouve l'hypothèse de Lambert selon laquelle l'intensité I d'une *radiation monochromatique* a diminué de dI (négatif) après avoir traversé une épaisseur dx d'un matériau dont le *coefficient d'absorption* est k pour la longueur d'onde choisie (fig. 9.18), soit :

$$-\frac{dI}{dx} = k I_x \quad (9.5)$$

En appelant I_0 l'intensité lumineuse de la radiation incidente en amont du milieu traversé d'épaisseur ℓ , l'expression 9.5 s'écrira sous la forme intégrée donnant l'intensité transmise I :

$$[\text{Ln } I_x]_{I_0}^I = -k [x]_0^\ell \quad (9.6)$$

soit
$$\text{Ln } \frac{I}{I_0} = -k \cdot \ell \quad (9.7)$$

ou encore :
$$I = I_0 e^{-k\ell} \quad (9.8)$$

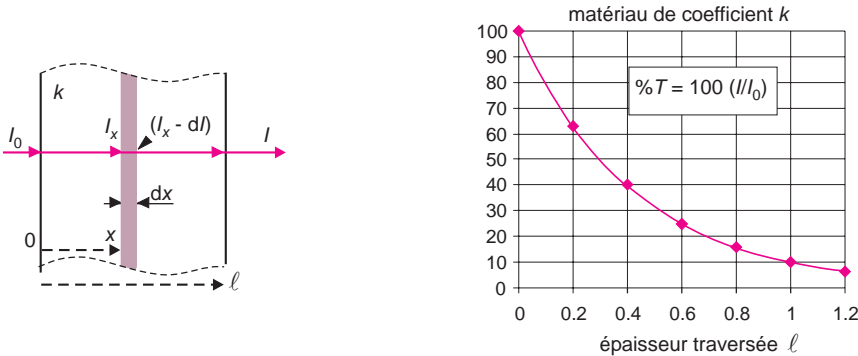


Figure 9.18 Absorption de la lumière par un matériau homogène, et représentation du % de transmittance en fonction de l'épaisseur traversée.

La lumière arrivant sur un échantillon peut être transmise, réfractée, réfléchie, diffusée ou absorbée. Ici on ne prend en compte que la partie absorbée.

Beer, en 1850, généralisa l'expression 9.8 au cas d'une solution faiblement concentrée d'un composé dissous dans un milieu transparent, c'est-à-dire non absorbant, en écrivant que k était proportionnel à la concentration molaire c de ce composé (fig. 9.19).

$$k = k' \cdot c \quad (9.9)$$

En remplaçant k par $k' \cdot c$ dans la relation 9.8, on obtient une expression qui est généralement connue sous la forme 9.4 dans laquelle l'*absorbance* A est représentée par l'une des expressions équivalentes :

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad \text{ou} \quad A = \log \frac{1}{T} \quad \text{ou} \quad A = \log \frac{100}{T \%} \quad \text{ou} \quad A = 2 - \log T \% \quad (9.10)$$

■ La loi de Beer et Lambert considérée à l'origine comme un postulat, a fait l'objet par la suite de nombreuses interprétations et démonstrations en partant d'hypothèses statistiques, cinétiques ou simplement logiques.

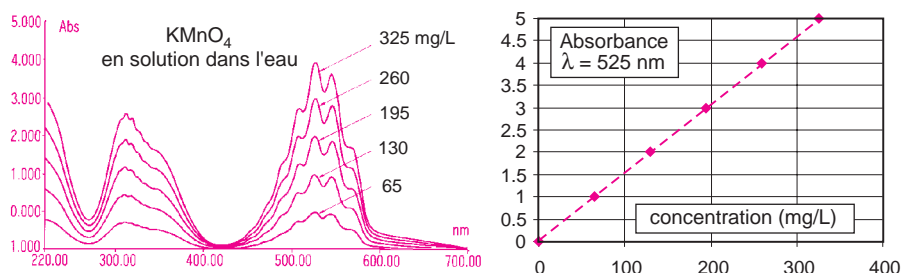


Figure 9.19 Illustration de la loi de Beer et Lambert.

Spectres de solutions aqueuses de concentrations croissantes en permanganate de potassium. Graphé des absorbances correspondantes mesurées à 525 nm montrant la croissance linéaire de ce paramètre.

Cette loi, qui ne concerne que la fraction de la lumière absorbée, est vérifiée dans les conditions suivantes :

- la lumière utilisée doit être monochromatique ;
- les concentrations doivent être faibles ;
- la solution ne doit être ni fluorescente ni hétérogène ;
- le soluté ne doit pas donner lieu à des transformations photochimiques ;
- le soluté ne doit pas donner des associations variables avec le solvant.

■ Quand, pour un dosage, on se contente de mesurer l'absorbance à une seule longueur d'onde, on choisit, en général, celle qui correspond au maximum d'absorption. D'autre part, pour que l'absorbance reflète correctement la concentration, il faut que la bande spectrale $\Delta\lambda$ qui atteint le détecteur, choisie par le paramètre de l'appareil appelé *largeur de fente* ou *bande passante*, soit beaucoup plus étroite (10 fois) que la largeur de la bande d'absorption mesurée à mi-hauteur.

9.9.2 Additivité des absorbances

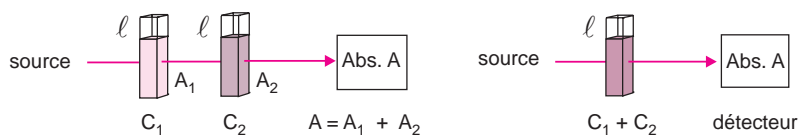


Figure 9.20 Additivité des absorbances.

Pour toute longueur d'onde, l'absorbance d'un mélange est égale à la somme des absorbances de chaque composant du mélange (pris à la même concentration) pour cette longueur d'onde.

La loi de Beer et Lambert est additive (fig. 9.20). Ceci veut dire que si on mesure l'absorbance A , dans une cuve d'épaisseur ℓ , d'un mélange de deux composés 1 et 2 en solution dans un solvant, on obtiendra la même absorbance totale si la lumière passe successivement à travers deux cuves d'épaisseur ℓ , placées l'une après l'autre, contenant l'une le composé 1 (Abs. A_1) et l'autre le composé 2 (Abs. A_2). Il faut bien sûr que les concentrations et le

solvant soient les mêmes que pour le mélange initial (on donne ici l'indice 1 au composé 1 et l'indice 2 au composé 2) :

$$A = A_1 + A_2 = \ell(\varepsilon_1 c_1 + \varepsilon_2 c_2) \quad (9.11)$$

Ce principe est illustré par l'étude des points isobestiques : considérons un composé A qui se transforme par une réaction du premier ordre en un composé B. Supposons que les spectres d'absorption de A et de B, enregistrés séparément dans un même solvant et à la même concentration, se coupent en un point I lorsqu'on les superpose (fig. 9.21). Pour la longueur d'onde du point I, les absorbances des deux solutions sont les mêmes, et par conséquent les coefficients ε_A et ε_B sont égaux ($\varepsilon_A = \varepsilon_B = \varepsilon$). Or dans ce type de transformation on a initialement A pur et pour finir B pur. Pour tout mélange intermédiaire, la concentration totale des mélanges de A et de B ne varie pas ($c_A + c_B = \text{Cste}$),

$$A_I = \varepsilon_A \ell c_A + \varepsilon_B \ell c_B = \varepsilon \ell (c_A + c_B) \quad (9.12)$$

Tous les spectres des mélanges A + B formés au cours du temps passeront donc par le point I, appelé point isobestique, où l'absorbance A conservera la même valeur.

Ces réseaux de courbes concourantes se rencontrent quand on étudie le virage d'un indicateur coloré en fonction du pH, ou au cours de l'étude des cinétiques de réaction.

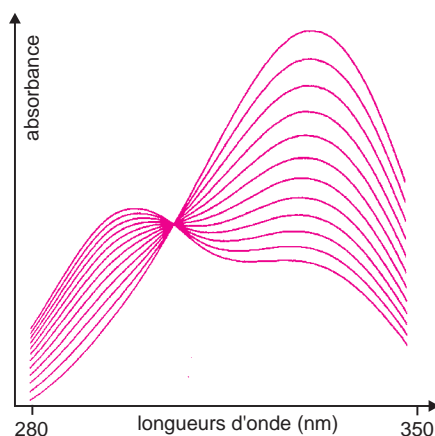


Figure 9.21 Point isobestique.

Hydrolyse alcaline à 25 °C du salicylate de méthyle. Superposition des spectres successifs enregistrés entre 280 et 350 nm à des intervalles de 10 min.

9.10 MÉTHODES UTILISÉES EN ANALYSE QUANTITATIVE

Quand un composé n'absorbe pas la lumière, il peut néanmoins faire l'objet d'un dosage photométrique si on peut le transformer préalablement à la mesure en un dérivé qui, lui, comporte un chromophore exploitable. Par cet artifice, il devient possible de doser toutes sortes d'espèces chimiques dont l'absorption est initialement soit très faible, soit dans une partie du spectre où coexistent d'autres absorptions qui interfèrent. À cette fin, la mesure d'absorbance est précédée d'une transformation chimique qui doit être à la fois spécifique, totale, rapide, reproductible et conduire à un dérivé stable en solution. C'est le principe des *tests colorimétriques*.

■ Le terme de colorimétrie vient de ce que les premiers dosages effectués dans ce domaine, bien avant l'invention des spectrophotomètres, se faisaient avec de la lumière naturelle (lumière blanche) et sans appareil particulier, par comparaison visuelle directe de la coloration de l'échantillon dosé avec celle de témoins de concentrations connues.

Les deux situations qui se présentent le plus souvent sont les suivantes :

- *Le composé à doser est présent dans une matrice dont certains constituants absorbent dans le même domaine spectral* : la mesure directe de l'absorbance due au seul composé est donc impossible (fig. 9.22a). Pour contourner cette difficulté, on transforme de façon spécifique le composé par une réaction totale en un dérivé dont la courbe d'absorption se situe dans une région libre de toute interférence avec la matrice (fig. 9.22, courbe b).
- *Le composé à doser n'a pas de chromophore exploitable à l'état brut* : on fait apparaître, ici encore, un chromophore de remplacement en dérivant l'espèce initiale suivant le même principe (fig. 9.22, courbes c et d).

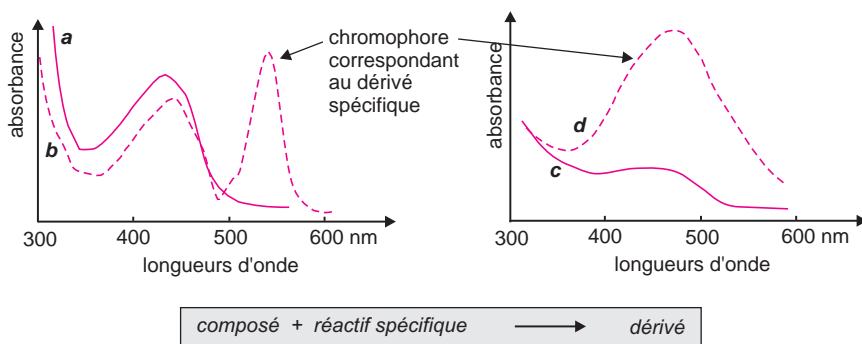


Figure 9.22 Illustration de deux situations fréquemment rencontrées.

Un composé masqué dans un mélange ou bien ne présentant pas d'absorption nette peut néanmoins être dosé par colorimétrie en faisant appel à une transformation chimique qui le transforme en un dérivé exempt d'interférences.

■ En colorimétrie, on préfère baser la mesure d'absorbance sur un chromophore situé vers les grandes longueurs d'onde, car on diminue le risque de superposition des absorptions propres aux différents composés. D'autre part, quand on fait précéder la mesure d'une réaction, il arrive qu'on ne connaisse pas la structure exacte du dérivé coloré dont on mesure l'absorbance ; néanmoins, en supposant que la réaction impliquée est quantitative, son coefficient molaire d'absorption est accessible à partir de la concentration molaire du composé utilisé en référence.

9.11 ANALYSE D'UN SEUL ANALYTE ET CONTRÔLE DE PURETÉ

Pratiquement, on commence par construire une courbe d'étalonnage $A = f(c)$ à partir de solutions de concentrations connues du composé à doser, soumises au même traitement que l'échantillon. Cette courbe, le plus souvent assimilable à une droite pour les solutions diluées, permet de déduire la concentration c_X de la solution inconnue.

On se contente quelquefois de préparer une seule solution étalon. Dans ce cas on prépare une solution de référence dont la concentration c_R est telle que son absorbance A_R est légèrement supérieure à celle que l'on attend de la solution inconnue A_X (fig. 9.23).

On applique alors la formule suivante pour calculer c_X :

$$c_X = c_R \frac{A_X}{A_R} \quad (9.13)$$

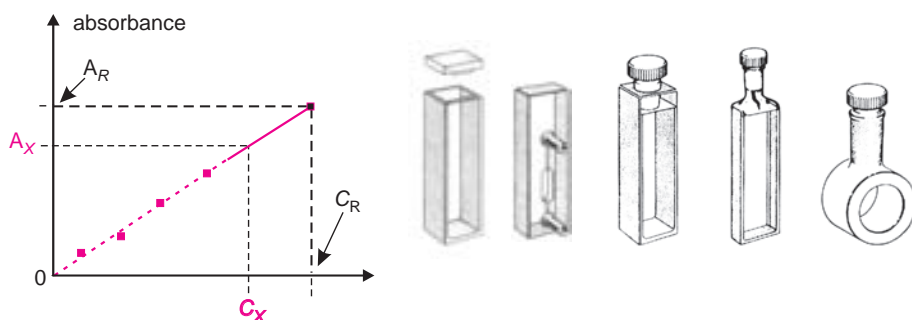


Figure 9.23 Courbe d'étalonnage et cuves classiques en verre optique ou en verre de silice.

Si on se contente de préparer une seule solution de référence, ceci revient à considérer que la courbe d'étalonnage est une droite qui passe par l'origine. La précision du résultat sera d'autant meilleure que la concentration inconnue sera proche de la concentration de référence (le résultat est déterminé par interpolation).

Le calcul classique de la concentration d'un analyte par la relation 9.13 conduit à un résultat erroné si l'échantillon contient une impureté (absente dans la solution de référence) qui absorbe également à la longueur d'onde de mesure. Aussi, fait-on assez souvent appel à une méthode baptisée *analyse de confirmation*.

On part de la constatation que pour tout composé pur, le rapport des coefficients d'absorption, déterminés à deux longueurs d'onde, est constant. Il est caractéristique du composé. Donc, si on effectue une ou deux mesures d'absorbance supplémentaires, décalées de quelques nanomètres par rapport à la mesure originale, on pourra calculer les rapports d'absorbance de la solution échantillon et les comparer à ceux qui auront été établis de la même façon avec un témoin pur. Si ces rapports sont différents, on en déduira qu'il y a une impureté. Le calcul de la concentration sera donc peu fiable dans ce cas.

■ Partant de ce principe, il est possible de contrôler l'homogénéité des pics d'élution en chromatographie liquide, à condition de disposer d'un détecteur UV permettant la mesure simultanée de l'absorbance à plusieurs longueurs d'onde (un détecteur à barrettes de diodes, par exemple). Toute variation, au cours de l'élution d'un constituant, du rapport des absorbances à deux longueurs d'onde, témoigne qu'il s'agit d'un mélange de composés sortant simultanément de la colonne (fig. 9.24). Cette méthode est cependant mise en défaut en cas de coélution parfaite de deux composés.

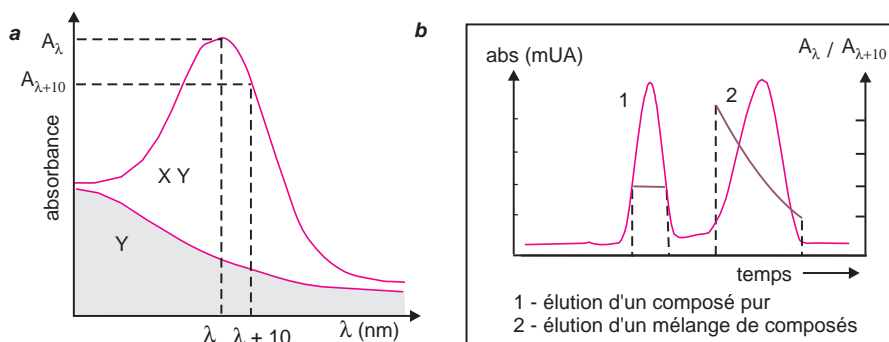


Figure 9.24 Analyse de confirmation.

a) Spectre d'un mélange ($X + Y$) et spectre de Y seul dans le même domaine (partie grisée) ; b) dessin illustrant un chromatogramme qui présente deux pics dont le premier est dû à un composé unique et le second à l'élution de deux composés légèrement décalés dans le temps. L'évolution du rapport des absorbances en cours d'élution permet de contrôler la pureté des composés élués. Ces variations sont habituellement mises en évidence par les logiciels sous forme de plages colorées.

9.12 ANALYSE MULTICOMPOSANTS (MCA)

Lorsqu'on est en présence d'un mélange de composés dont les spectres d'absorption individuels sont connus, on peut en déterminer la composition. Selon la loi d'additivité (relation 9.11), le spectre du mélange correspond à la somme pondérée des spectres de chacun des constituants. La méthode classique de calcul est rappelée ici pour mémoire. Elle n'est plus utilisée telle quelle, mais au travers des outils logiciels.

9.12.1 Méthode algébrique de base

Soit un mélange de trois composés a , b , c en solution (conc. c_a , c_b , c_c). On mesure les absorbances de cette solution à trois longueurs d'onde λ_1 , λ_2 et λ_3 , soit A_1 , A_2 et A_3 . Connaissant les valeurs des absorbances spécifiques de chacun des trois composés pris isolément pour ces trois longueurs d'onde (9 valeurs au total, de ε_a^1 à ε_c^3) on écrira, par application de la loi d'additivité des absorbances, le système suivant de trois équations (on suppose que le trajet optique des cuves utilisées est de 1 cm) :

$$\begin{aligned} \text{à } \lambda_1 & \quad A_1 = \varepsilon_a^1 c_a + \varepsilon_b^1 c_b + \varepsilon_c^1 c_c \\ \text{à } \lambda_2 & \quad A_2 = \varepsilon_a^2 c_a + \varepsilon_b^2 c_b + \varepsilon_c^2 c_c \\ \text{à } \lambda_3 & \quad A_3 = \varepsilon_a^3 c_a + \varepsilon_b^3 c_b + \varepsilon_c^3 c_c \end{aligned}$$

La résolution de ce système, qui correspond à une matrice $[3 \times 3]$, permet de trouver les trois concentrations cherchées c_a , c_b et c_c .

$$\begin{bmatrix} c_1 \\ c_2 \\ c_3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_1 \\ A_2 \\ A_3 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} \varepsilon_a^1 & \varepsilon_b^1 & \varepsilon_c^1 \\ \varepsilon_a^2 & \varepsilon_b^2 & \varepsilon_c^2 \\ \varepsilon_a^3 & \varepsilon_b^3 & \varepsilon_c^3 \end{bmatrix}^{-1} \quad (9.14)$$

Cette approche donne de bons résultats quand les composés ont des spectres significativement différents, mais elle devient moins précise quand les spectres sont voisins puisqu'une petite erreur de mesure peut conduire à une variation importante du résultat. Pour cette raison les appareils à barrettes de diodes utilisent plusieurs dizaines de points de données. Le système à résoudre (rel. 9.14) devenu surdéterminé conduit à de meilleurs résultats.

9.12.2 Régression linéaire multilongueurs d'onde (méthode MLRA)

L'analyse des mélanges a donné lieu à diverses méthodes, rendues possibles avec les spectromètres qui enregistrent les données. Les logiciels d'analyse quantitative peuvent utiliser un grand nombre de points extraits des spectres de l'échantillon à doser et des solutions d'étalonnage. À titre d'exemple est décrite, ci-après, une méthode de régression linéaire qui permet de neutraliser le bruit de fond et donc d'améliorer le résultat d'une analyse de deux composés connus, présents dans un échantillon (fig. 9.25).

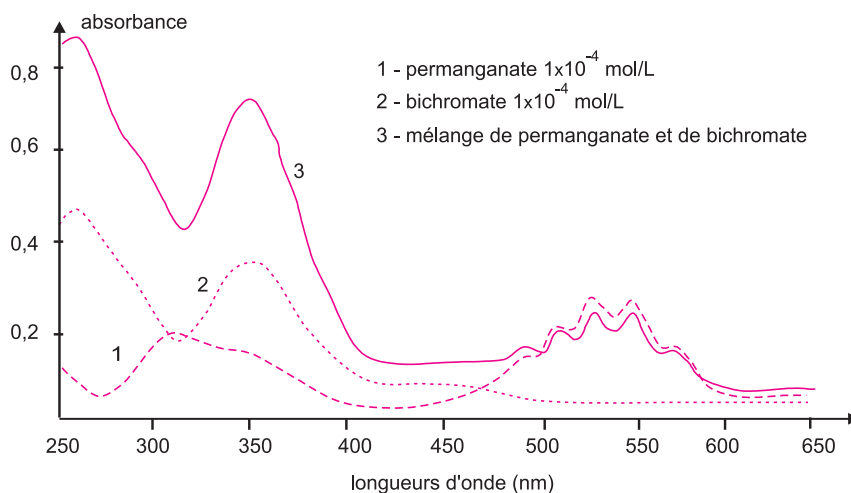


Figure 9.25 Analyse multicomposants.

Spectres d'une solution 1×10^{-4} M en permanganate, d'une solution 1×10^{-4} M de bichromate et d'une solution contenant $0,8 \times 10^{-4}$ M de permanganate et $1,8 \times 10^{-4}$ M de bichromate (d'après Bianco et Coll., *J. Chem Educ.*, 1994, 66(2), p. 178).

L'appareil utilise trois enregistrements mis en mémoire : un spectre de l'échantillon (qui contient le mélange des deux composés dont on veut trouver les concentrations) et deux spectres, dans le même domaine spectral, correspondant chacun à une solution de référence de concentration connue de l'un et de l'autre composé.

Pour chaque longueur d'onde, la loi d'additivité des absorbances permet d'écrire que l'absorbance du mélange considéré des deux composés (notés a et b), supposés n'interagissant pas l'un sur l'autre, est donnée par l'expression :

$$A = \varepsilon_a \ell c_a + \varepsilon_b \ell c_b \quad (9.15)$$

Pour chacun des deux spectres de référence, on a, en supposant que l'épaisseur des cellules de mesure est $\ell = 1 \text{ cm}$:

– pour le composé a $A_{\text{réf.a}} = \varepsilon_a \cdot c_{\text{réf.a}}$ (9.16)

– pour le composé b $A_{\text{réf.b}} = \varepsilon_b \cdot c_{\text{réf.b}}$ (9.17)

Ces deux expressions permettent de calculer les coefficients d'absorption ε de chaque constituant pur, à chaque longueur d'onde considérée. On peut donc ré-écrire 9.15 sous la forme :

$$A = \frac{A_{\text{réf.a}}}{c_{\text{réf.a}}} c_a + \frac{A_{\text{réf.b}}}{c_{\text{réf.b}}} c_b \quad (9.18)$$

En divisant le premier membre par $A_{\text{réf.a}}$, on aura pour chaque longueur d'onde :

$$\left(\frac{A}{A_{\text{réf.a}}} \right) = \frac{c_a}{c_{\text{réf.a}}} + \frac{c_b}{c_{\text{réf.b}}} \cdot \left(\frac{A_{\text{réf.b}}}{A_{\text{réf.a}}} \right) \quad (9.19)$$

Le premier membre de l'expression 9.19 est donc une fonction affine du rapport des absorbances figurant au second membre. Les valeurs calculées sont sur une droite dont la pente et l'ordonnée à l'origine permettent de calculer c_a et c_b .

Le résultat sera d'autant plus précis que le nombre de points utilisés sera grand.

9.12.3 Déconvolution

D'assez nombreux logiciels de traitement de données permettent de trouver la composition de mélanges à partir des spectres. L'une des méthodes les plus connues utilise l'algorithme du filtre de Kalman des moindres carrés. Elle permet de trouver de manière automatique, par approximations successives, le spectre de la solution échantillon par addition des spectres en mémoire de chacun des composés affectés d'un coefficient de pondération (loi d'additivité des absorbances). Ce sont les méthodes connues sous les noms de PLS (*partial least square*), PCR (*principal component regression*), ou MLS (*multiple least squares*) (fig. 9.26).

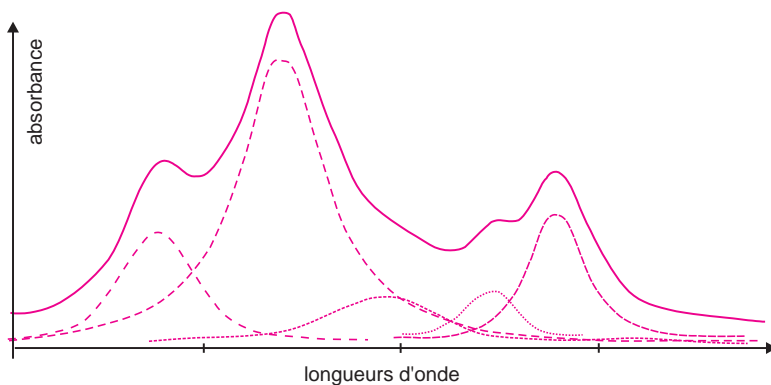


Figure 9.26 Déconvolution de courbe spectrale.

À partir du spectre expérimental d'un mélange de 5 composés (le plus externe sur la figure), le logiciel retrouve la proportion de chacun d'eux (dont les spectres individuels sont connus par ailleurs).

9.13 MÉTHODES DE CORRECTION DE LIGNE DE BASE

Certains échantillons, tels les fluides biologiques, contiennent des particules micellaires en suspension qui créent par diffusion de la lumière (effet Tyndall) une absorption supplémentaire. Celle-ci varie de manière régulière avec la longueur d'onde (fig. 9.27).

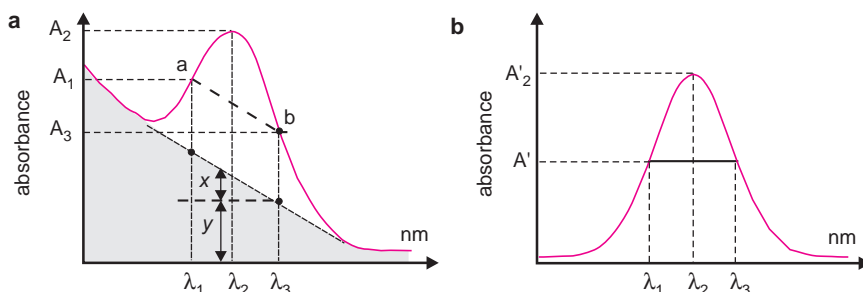


Figure 9.27 Illustration se rapportant aux calculs de la méthode de Morton et Stubbs.

Plusieurs méthodes cherchent à corriger ce phénomène en retranchant de l'absorbance mesurée la part qui n'est pas due à l'analyte. Il s'agit en fait de corrections de la ligne de base faites à partir de mesures réalisées à plusieurs longueurs d'onde.

9.13.1 Modélisation par une fonction polynomiale

On suppose que la variation de la ligne de base est représentable par une fonction $A = k \lambda^n$. Pour trouver k et n , on repère une plage où l'analyte n'absorbe pas afin que le logiciel utilise cette zone de la courbe pour calculer ces coefficients par une méthode des moindres carrés, (sachant que $\log a = \log k + n \log \lambda$). Ensuite quelle que soit la longueur d'onde du dosage, on pourra retrancher l'absorbance due au fond absorbant.

9.13.2 Méthode des trois points (Morton-Stubbs)

La méthode de Morton et Stubbs (ainsi que la méthode faisant appel aux courbes dérivées, cf. 9.16) permet une correction efficace de la ligne de base à condition que l'absorption sous-jacente varie linéairement dans la zone de mesure. Ainsi, dans une situation telle que celle représentée sur la figure 9.27a, il faut, pour quantifier le composé, corriger l'absorbance A_2 lue au maximum λ_2 en retranchant ce qui correspond aux valeurs notées x et y .

Pour cela on va faire un spectre de référence du composé pur, afin de choisir deux longueurs d'onde λ_1 et λ_3 telles que les coefficients d'absorbance soient les mêmes (fig. 9.27b). Ainsi sur la figure, on a pour λ_1 et λ_3 la même absorbance A' et une absorbance A'_2 au maximum λ_2 . On calcule le rapport R entre ces deux valeurs ($R = A'_2/A'$). On effectue ensuite, sur le spectre de l'échantillon à doser, le rapport des absorbances à ces deux mêmes longueurs d'onde. À condition d'assimiler la ligne de base à une droite de même pente que le segment ab , la valeur de x peut alors être déduite par calcul (voir figure) :

$$x = (A_1 - A_3) \frac{(\lambda_3 - \lambda_2)}{(\lambda_3 - \lambda_1)} \quad (9.20)$$

À partir de R et du rapport A_2/A_3 de l'échantillon, on accède à y sachant que le rapport des absorbances, après correction de x et y , conserve la valeur R (fig. 9.26) :

$$R = \frac{A_2 - (x + y)}{A_3 - y}$$

soit :

$$y = \frac{RA_3 - A_2 + x}{R - 1} \quad (9.21)$$

La connaissance de x et y permet de calculer l'absorbance corrigée A selon :

$$A = A_2 - x - y$$

Cette méthode nécessite simplement de disposer d'un spectre du composé pur. Elle est indépendante de la concentration de la solution de référence et fait partie des logiciels de traitement des spectres UV.

9.14 DISTRIBUTION DES ERREURS RELATIVES DUES AUX APPAREILS

Pour beaucoup de spectrophotomètres il est possible de faire des mesures allant jusqu'à 4 ou 5 unités d'absorbance. Sachant que ces valeurs élevées correspondent à des intensités transmises qui sont extrêmement faibles ($I/I_0 = 10^{-5}$ pour $A = 5$), on peut craindre que les résultats soient moins fiables. Il est donc important de considérer les limites techniques du matériel.

On reconnaît trois sources d'erreurs instrumentales sur la transmittance. Il s'agit de causes indépendantes qui peuvent s'ajouter (fig. 9.28) :

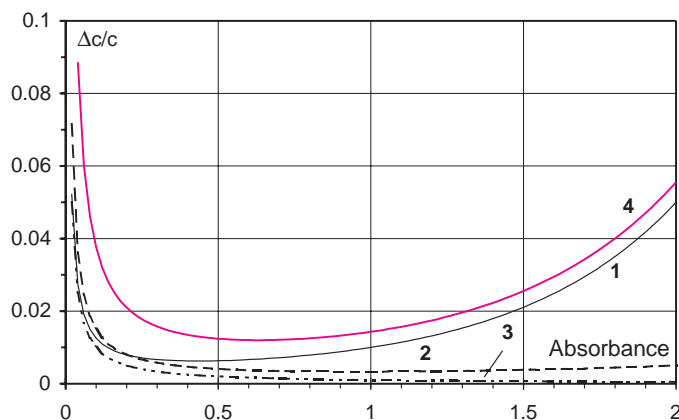


Figure 9.28 Courbes représentatives moyennes de chacune des causes d'erreur dans la mesure de l'absorbance, ainsi que la courbe globale résultant de leur somme (4) (voir texte).

► *le bruit de fond de la source lumineuse.* Ce terme ΔT_1 est considéré comme constant et indépendant de T : $\Delta T_1 = k$ (courbe 1) ;

- *le bruit de fond du photomultiplicateur*. Ce terme ΔT_2 varie en fonction de T , suivant une expression complexe, traduite par la relation suivante (courbe 2) :

$$\Delta T_2 = k_2 \sqrt{T^2 + T} \quad (9.22)$$

- *les réflexions et diffusions lumineuses* sur le parcours optique de l'instrument. Ce terme est proportionnel à T : $\Delta T_3 = k_3 T$ (courbe 3).

Comme ces causes d'erreur s'ajoutent, l'erreur totale sur la concentration correspond — en admettant les trois expressions ci-dessus — à une courbe résultante dont l'ordonnée en chaque point est la somme des ordonnées des trois autres. Cette courbe passe par un minimum qui se situe généralement pour $A = 0,7$. Pour les dosages il est donc conseillé d'ajuster les dilutions afin que les absorbances se situent dans cette zone optimale.

À partir de la loi de Beer et Lambert il est également possible de relier l'erreur relative, faite sur la concentration c , à l'erreur relative faite sur la transmittance T (courbe 4).

$$\frac{\Delta c}{c} = \frac{1}{\ln T} \cdot \frac{\Delta T}{T} \quad (9.23)$$

9.15 SPECTROMÉTRIE DÉRIVÉE

Le principe consiste à calculer par un procédé mathématique les courbes dérivées des spectres pour améliorer la précision de certains dosages. Ce procédé est appliqué par exemple quand l'analyte se confond dans le spectre global du mélange dans lequel il se trouve. Les tracés des courbes dérivées sont en effet beaucoup plus accidentés que ceux des spectres d'origine (appelés *spectre d'ordre zéro*) dont ils mettent en relief les faibles variations de pente (fig. 3.29). Le processus d'obtention de la courbe *dérivée première*, $dA/d\lambda = (d\varepsilon/d\lambda) \cdot \ell \cdot c$, peut être étendu aux dérivées successives (n^e dérivée).

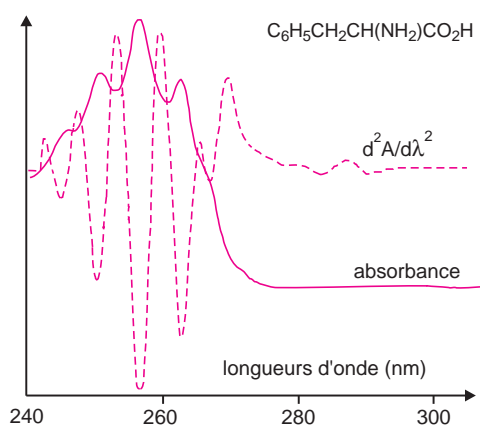


Figure 9.29 Spectre UV de la phénylalanine et courbe de sa dérivée seconde.

Les logiciels des spectromètres conduisent à ces courbes dérivées par calcul, et non plus par des modifications du montage optique comme il en était à l'origine.

La courbe correspondant à la *dérivée seconde*, fait correspondre aux points d'inflexion du spectre d'ordre zéro, des points d'annulation de pente, c'est-à-dire des maxima ou des minima (fig. 9.30). La quatrième dérivée met encore mieux en évidence les faibles variations d'absorbance du spectre initial.

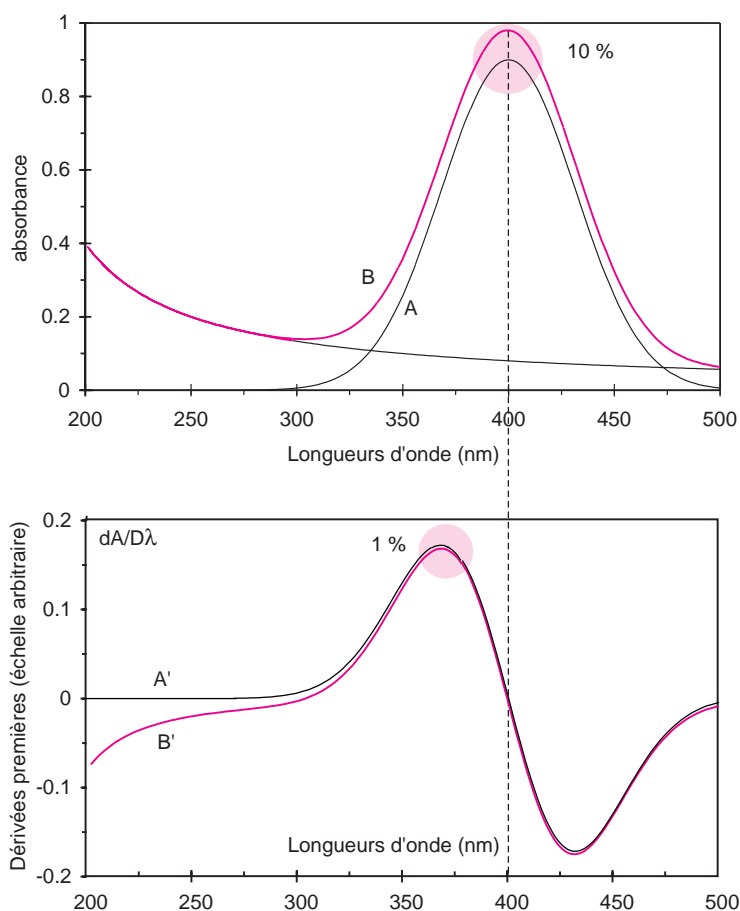


Figure 9.30 Effet d'un phénomène de diffusion sur un spectre enregistré en absorbance et sur sa courbe dérivée.

Comparaison des courbes dérivées correspondant pour A au spectre d'un composé en solution sans phénomène de diffusion et pour B au même spectre en présence de diffusion. On observe que la diffusion perturbe ici de 10 % l'absorbance mais de seulement 1 % environ la valeur de l'amplitude de la courbe dérivée (spectres modélisés à partir de fonctions correspondant à des courbes de Gauss).

De nombreux dosages gagneraient à utiliser ce principe, sachant que la conduite d'un dosage à partir des courbes dérivées n'est pas plus difficile qu'à partir des spectres en absorbance. L'amplitude entre le maximum et le minimum de la courbe dérivée n^e , est proportionnelle à la valeur de l'absorbance de la solution. La courbe d'étalonnage est établie à partir de plusieurs solutions étalons de concentrations différentes auxquelles le même trai-

tement mathématique est appliqué, ainsi qu'à la solution échantillon. L'intérêt du procédé est manifeste dans trois situations où l'absorbance est faussée :

- si le spectre de la solution échantillon présente un décalage vers le haut par suite d'un fond d'absorption uniforme, la courbe dérivée, qui n'est sensible qu'aux variations de pente de la courbe d'ordre zéro, n'en sera nullement affectée.
- si on est en présence d'un phénomène de diffusion de la lumière au sein de la solution échantillon, qui se traduit par un fond d'absorption qui croît modérément vers les petites longueurs d'onde, là encore, les courbes dérivées seront peu affectées (fig. 9.30).
- une absorbance due à l'analyte, quasiment invisible sur le spectre original, parce que noyée dans une absorbance régulière provenant d'un effet de matrice, devient détectable.

9.16 COLORIMÉTRIE VISUELLE PAR TRANSMISSION OU RÉFLEXION

La colorimétrie visuelle, utilisée depuis plus de deux siècles, est une forme simplifiée de la spectrométrie d'absorption instrumentale. Elle se pratique intensément étant donné son faible coût et sa précision bien souvent étonnante.

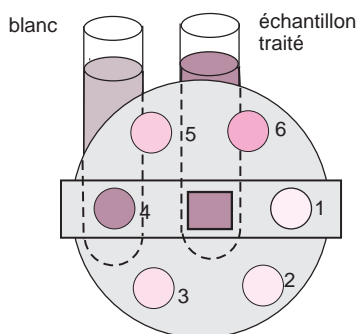


Figure 9.31 Colorimétrie visuelle.

À gauche, comparateur à disque. L'utilisation de cet appareil consiste à choisir, par rotation du porte-filtres, celui qui permet, quand il est superposé au « blanc analytique », d'égaliser au mieux les colorations des deux tubes. L'observation se fait par transparence en lumière blanche. Le tube central contient l'échantillon après traitement. Le disque est étalonné pour un dosage particulier. À droite, un réflectomètre portatif qui permet de s'affranchir de l'appréciation de l'œil humain (reproduit avec l'autorisation de la société Merck).

Les colorimètres les plus simples (fig. 9.31), utilisés pour les dosages de routine, sont des comparateurs visuels apparentés aux tubes de Nessler, d'origine bien ancienne. Ces derniers sont constitués par des tubes de verre à fond plat avec trait de jauge, que l'on remplit avec différentes solutions de concentrations étalons et éventuellement d'un agent de dérivation. La solution à analyser, placée dans un tube identique, est intercalée dans la série des témoins précédents. Ces tubes, disposés sur un fond de lumière blanche, sont observés par transparence. La concentration cherchée est intermédiaire entre celles des deux témoins

dont les colorations les plus proches encadrent celle du tube contenant l'échantillon à doser. Ces tests sélectifs, prêts à l'emploi et ne nécessitant aucun appareil, complètent les méthodes établies et aident, par leur mise en œuvre immédiate, à maîtriser le flot des analyses semi-quantitatives en tous genres.

■ Les innombrables tests, présentés sous forme de bandelettes qui se colorent plus ou moins intensément lorsqu'elles sont trempées dans les milieux appropriés, sont autant d'applications courantes de la colorimétrie. Cependant le résultat, issu d'un examen visuel de la lumière réfléchie, est donc à rattacher à la réflectométrie plutôt qu'à la colorimétrie par transmission.

La néphélométrie, technique différente de la colorimétrie, fait cependant également appel à la même loi de Beer et Lambert. La méthode consiste à mettre en jeu la formation d'un précipité et, à partir de la lumière absorbée à une longueur d'onde donnée, à déterminer la concentration du précurseur. Par exemple, pour doser l'ion sulfate, on ajoute un sel de baryum soluble. Il se forme un précipité de sulfate de baryum dont on mesure l'absorbance, après avoir été stabilisé avec un polymère hydrosoluble, tel le Tween®.

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.secomam.fr
www.jascoinc.com
www.varianinc.com

www.spectronic.co.uk
www.gbcsoci.com

www.shimadzu.com
www.oceanoptics.com

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 9.1

Une eau polluée contient du chrome ($M = 52 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) à la concentration massique d'environ 0,1 ppm. On choisit, pour son dosage, le complexe Cr^{VI} avec le diphénylcarbazine ($\lambda_{\text{max}} = 540 \text{ nm}$, $\epsilon_{\text{max}} = 41\,700 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Proposer une valeur du trajet optique de la cuve pour que l'absorbance soit de l'ordre de 0,40.

Exercice 9.2

Une solution aqueuse de permanganate de potassium ($c = 1,28 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) a une transmittance de 0,5 à 525 nm, si on utilise une cuve de 10 mm de parcours optique.

a) Calculer le coefficient d'absorption molaire du permanganate pour cette longueur d'onde ?

b) Si on double la concentration, calculer l'absorbance et la transmittance de la nouvelle solution ?

Exercice 9.3

Les peintures et vernis extérieurs doivent être protégés de l'effet des radiations solaires pour ralentir leur dégradation (photolyse et réactions photochimiques).

Quelle doit être la concentration, en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, d'un additif UV (M) pour que 90 % du rayonnement soit absorbé sur une épaisseur de 0,3 mm ?

Données : $M = 500 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; $\varepsilon_{\text{max}} = 15\,000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour $\lambda_{\text{max}} = 350 \text{ nm}$.

Exercice 9.4

On veut déterminer la concentration (mol/L) de deux sels A ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2$) et B ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$) dans un échantillon inconnu en solution aqueuse. On enregistre un spectre dans le visible de chacun de ces deux composés pris isolément en solution aqueuse ainsi que de la solution échantillon à analyser. Le trajet optique des cuves utilisées est 1 cm.

Les valeurs des absorbances mesurées à 510 et 575 nm sur les trois spectres sont les suivantes : le composé A ($1,5 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) présente une absorbance de 0,714 à 510 nm et de 0,0097 à 575 nm. Le composé B ($6 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) présente une absorbance de 0,298 à 510 nm et de 0,757 à 575 nm. La solution à doser présente une absorbance de 0,40 à 510 nm et de 0,577 à 575 nm.

- Calculer les 4 coefficients d'absorption molaire $\varepsilon_{\text{A}(510)}$, $\varepsilon_{\text{B}(510)}$, $\varepsilon_{\text{A}(575)}$ et $\varepsilon_{\text{B}(575)}$.
- Calculer les concentrations molaires ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) des deux sels A et B dans la solution échantillon.

Exercice 9.5

On veut déterminer la concentration (mol/L) en KMnO_4 et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dans une solution aqueuse inconnue par la méthode MLRA.

On prépare deux solutions de référence, l'une KMnO_4 ($1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$) et l'autre en $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ($1 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$). Les spectres de la solution inconnue et des deux solutions de référence sont enregistrés entre 250 et 400 nm. Le trajet optique des cuves utilisées est 1 cm.

À partir des résultats, au nombre de 5, rassemblés dans le tableau ci-dessous :

- Trouver l'équation de la droite de régression

$$A_{\text{échant}}/A_{\text{permanganate}} = f(A_{\text{bichromate}}/A_{\text{permanganate}}).$$

- Calculer les concentrations molaires ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) en KMnO_4 et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dans la solution échantillon.

λ (nm)	Abs. MnO_4^- (réf.)	Abs. $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ (réf.)	échantillon
266	0,042	0,410	0,766
288	0,082	0,283	0,571
320	0,168	0,158	0,422
350	0,125	0,318	0,672
360	0,056	0,181	0,366

Exercice 9.6

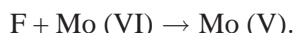
Un indicateur coloré acido-basique se comporte comme un acide faible HA de constante d'acidité K_a .

On prépare diverses solutions de même concentration C_0 de cet indicateur dont on fait varier le pH sans dilution. On mesure, dans les mêmes conditions ($\ell = 1$ cm et $\lambda = 595$ nm) l'absorbance des différentes solutions préparées. On admettra que seule la forme basique absorbe à 595 nm et que la relation de Beer Lambert est utilisable pour les quatre mesures. On obtient les valeurs suivantes :

pH	8,31	8,71	9,09	12
A	0,326	0,642	1,000	1,640

Calculer la valeur de la constante d'acidité de l'indicateur.

Le fructose F réduit le molybdène VI en molybdène V (bleu de molybdène) suivant le schéma :



Afin de déterminer l'ordre partiel « α » de la réaction par rapport au fructose, on ajoute à une solution de fructose un grand excès de molybdate d'ammonium. On suit la cinétique de cette réaction en mesurant, à différents instants, l'absorbance du mélange à 720 nm, longueur d'onde où seul Mo (V) absorbe.

On obtient les résultats suivants :

t (min)	0	10	20	30	50	infini
A	0	0,175	0,302	0,384	0,494	0,600

Vérifier que la réaction est d'ordre 1 par rapport au fructose et calculer la constante de vitesse apparente k' .

Chapitre 10

Spectrométrie du moyen et du proche infrarouge

L'infrarouge analytique met à profit la plage des radiations électromagnétiques comprise entre 1 et 50 μm pour identifier ou doser des composés par des procédés basés sur l'absorption ou la réflexion de la lumière par l'échantillon. Cette bande spectrale est divisée en proche infrarouge (de 1 à 2,5 μm) et en moyen infrarouge (2,5–50 μm). Bien que le domaine du proche infrarouge soit pauvre en absorptions spécifiques, il a pris une grande importance dans les laboratoires de contrôle comme moyen d'analyse quantitative. Le domaine du moyen infrarouge est, par contre, plus riche en informations sur les structures des composés examinés. De ce fait, il est très utilisé comme procédé non destructif pour identifier les composés moléculaires organiques dont il permet de garder une sorte d'empreinte. Pour effectuer ces analyses, on dispose d'une panoplie d'appareils allant des spectromètres à transformée de Fourier aux divers analyseurs portables de type dispersif ou non, spécialisés dans le dosage de composés prédéfinis (analyse des gaz et des vapeurs) ou qui permettent de faire des mesures en continu avec des sondes à immersion sur les unités de production. La spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier, qui complète la méthode dispersive initiale, offre de nombreuses possibilités de traitement des spectres et permet des applications dans l'analyse de micro-échantillons structurés (microanalyse infrarouge).

10.1 ORIGINE DE L'ABSORPTION LUMINEUSE DANS L'INFRAROUGE

Dans le proche et le moyen infrarouge, l'absorption de la lumière par la matière a pour origine l'interaction entre les radiations de la source lumineuse et les liaisons chimiques. Plus précisément, on sait que les atomes situés aux deux extrémités d'une liaison sont animés d'un mouvement de vibration l'un par rapport à l'autre et que s'ils sont différents, ils forment un dipôle électrique oscillant à cette même fréquence. Si on irradie une telle liaison non symétrique par une source lumineuse monochromatique dont la fréquence est la même que la fréquence de vibration, il va naître une interaction avec le dipôle électrique de la liaison. Autrement dit la composante électrique de l'onde pourra transmettre son énergie à la liaison à condition qu'il y ait accord entre sa fréquence mécanique de vibration et la fréquence électromagnétique de la radiation (fig. 10.1). Cette approche simplifiée explique qu'en l'absence de dipôle permanent, ce qui est le cas des molécules telles O_2 , N_2 , Cl_2 , aux liaisons non polaires, il n'y ait pas couplage avec l'onde électromagnétique et qu'aucune absorption d'énergie ne se produise. Ces liaisons sont dites « transparentes » dans le moyen infrarouge.

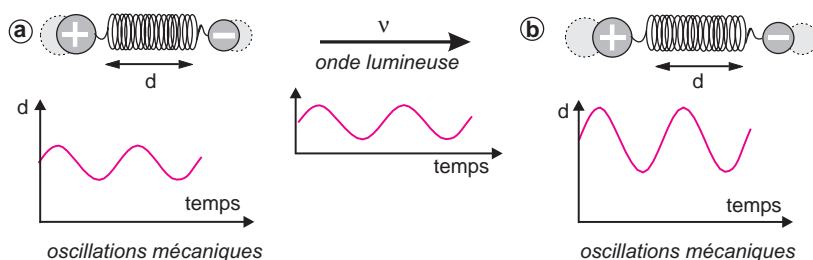


Figure 10.1 Interprétation « mécanique » de l'interaction d'une onde lumineuse avec une liaison polarisée.

La fréquence mécanique de l'onde n'est pas changée par absorption du photon, seule son amplitude croît.

10.2 PRÉSENTATION DES ABSORPTIONS DANS L'INFRAROUGE

L'absorption de l'échantillon, qui varie suivant la longueur d'onde des radiations émises par la source, est présentée sur un document de base obtenu avec le spectromètre, et appelé *spectre infrarouge*. L'ordonnée du graphe représente le rapport des intensités transmises, avec et sans échantillon, calculé pour chaque longueur d'onde inscrite en abscisse. Ce quotient est appelé *transmittance* T . Sur le graphe il est souvent remplacé par son pourcentage ($\%T$) ou par l'*absorbance*, $A = \log(1/T)$. Si l'étude a été faite en lumière réfléchie ou diffusée, on utilise des unités de *pseudo-absorbance* (cf. 10.9.2). Enfin, il est très fréquent de substituer aux longueurs d'onde leur équivalent exprimé en *nombre d'onde* $\bar{\nu}$ dont les unités sont en cm^{-1} ou kaysers, (formule 10.1). La figure 10.2 correspond à un tel spectre enregistré dans le moyen infrarouge, entre 2,5 et 25 μm . Dans cet exemple

$$\bar{\nu}_{\text{cm}^{-1}} = \frac{1}{\lambda_{\text{cm}}} \quad (10.1)$$

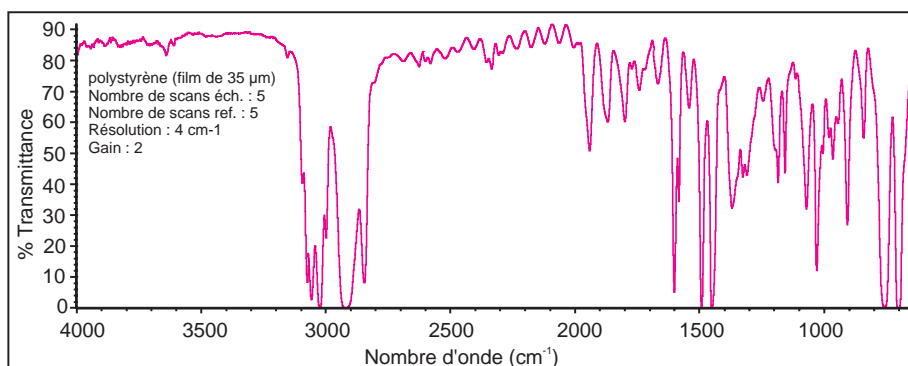


Figure 10.2 Spectre d'un film de polystyrène dans le moyen infrarouge.

Représentation habituelle d'un spectre, avec en abscisse une échelle en cm^{-1} (voir formule 10.1), linéaire sur toute l'étendue spectrale, et en % de transmittance en ordonnée (pour une observation plus aisée de la partie droite du spectre, on fait assez souvent un changement d'échelle à 2 000 cm^{-1} , voir figure 10.9). La transmittance est quelquefois remplacée par l'absorbance A ($A = -\log T$). L'échelle, en cm^{-1} , (ou kaysers) est linéaire en énergie ($E = hc/\lambda$), et va en diminuant de la gauche vers la droite (des fortes aux faibles énergies).

10.3 BANDES DE VIBRATION-ROTATION DANS L'INFRAROUGE

Excepté à la température de zéro Kelvin, les atomes des molécules sont en perpétuel mouvement. Chacun d'eux a trois *degrés de liberté* si l'on se réfère aux trois coordonnées cartésiennes classiques. Tous ces mouvements confèrent à chaque molécule isolée une énergie mécanique totale. La théorie pose comme postulat qu'elle résulte de la réunion de termes quantifiés indépendants nommés énergie de rotation $E_{\text{Rot.}}$, énergie de vibration $E_{\text{Vib.}}$ et énergie électronique moléculaire $E_{\text{Elec.}}$:

$$E_{\text{Tot.}} = E_{\text{Rot.}} + E_{\text{Vib.}} + E_{\text{Elec.}} \quad (10.2)$$

Les valeurs de ces énergies sont très différentes entre elles. Selon l'hypothèse de Born-Oppenheimer, elles peuvent varier indépendamment les unes des autres.

■ Dans le moyen infrarouge, une source émettant une radiation de $1\,000\text{ cm}^{-1}$ correspond à des photons dont l'énergie est de $E = hc\bar{\nu} = 0,125\text{ eV}$. Si un tel photon est absorbé par une molécule, son énergie totale sera augmentée de cette valeur. La théorie montre que le terme $E_{\text{vib.}}$ sera modifié mais que le terme $E_{\text{Elec.}}$ ne sera pas perturbé.

Comme les échantillons ordinaires sont sous forme condensée liquide ou solide (purs ou en solution) et non pas sous forme d'espèces isolées, il se produit de nombreuses interactions dipôle-dipôle entre les espèces présentes, ce qui perturbe les niveaux d'énergie, et par suite les longueurs d'onde d'absorption. On est donc toujours en présence de spectres formés de pics élargis appelés bandes, pouvant s'étendre sur des dizaines de cm^{-1} qu'aucun appareil ne permet de séparer en transitions individuelles (fig. 10.3).

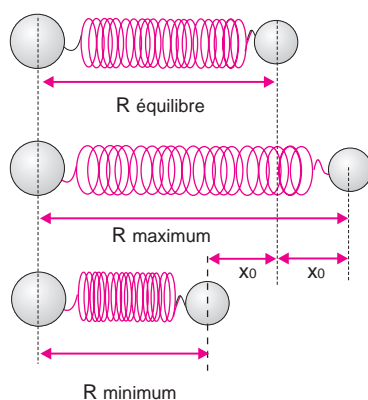


Figure 10.3 Une molécule diatomique représentée sous la forme d'un oscillateur harmonique. Le terme d'oscillateur harmonique, vient de ce que l'élongation est proportionnelle à la force exercée, alors que la fréquence ν_{Vib} en est indépendante.

Seules les petites molécules di- ou triatomiques prises à l'état gazeux et sous faible pression conduisent à des spectres comportant des bandes fines et régulières dont les positions permettent de retrouver les divers états énergétiques prévus par la théorie (fig. 10.5).

10.4 MODÈLE SIMPLIFIÉ DES INTERACTIONS VIBRATIONNELLES

Pour modéliser les vibrations des liaisons, on se réfère à l'oscillateur harmonique, ensemble formé par deux masses pouvant glisser sans frottement sur un plan et réunies par un ressort (fig. 10.3). Si on écarte les deux masses d'une valeur x_0 par rapport à la distance d'équilibre R_e , et qu'on relâche le système, celui-ci se met à osciller avec une période qui dépend de la constante de raideur du ressort k ($\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$) et des masses en présence. La fréquence approchée est donnée par la loi de Hooke (formule 10.3) dans laquelle μ (kg) représente la masse réduite du système.

$$\nu_{\text{vib.}} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (10.3)$$

avec

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2} \quad (10.4)$$

■ L'énergie mécanique de vibration de ce modèle simple $E_{\text{vib.}}$, peut varier de manière continue. Après une élongation Δx_0 faible (mais quelconque), par rapport à la distance d'équilibre R_e , elle vaut :

$$E_{\text{vib.}} = \frac{1}{2} k \Delta x_0^2 \quad (10.5)$$

Pour une liaison :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (10.6)$$

avec :

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} \quad (10.7)$$

Le modèle précédent est applicable à la liaison chimique qui relie deux atomes, à condition de faire intervenir l'aspect quantique qui régit les espèces aux dimensions atomiques. Une liaison, dont la fréquence de vibration est ν , pourra absorber une radiation lumineuse à condition que sa fréquence soit identique. Son énergie s'accroîtra du quantum $\Delta E = h\nu$. Selon cette théorie, l'expression simplifiée 10.8 donne les valeurs possibles de E_{vib} :

$$E = h\nu (V + 1/2) \quad (10.8)$$

$V = 0, 1, 2, \dots$, est appelé nombre quantique de vibration. Il ne peut varier que d'une unité ($\Delta V = +1$, transition dite de « simple quantum »). Les différentes valeurs de l'expression 10.5 sont séparées par un même intervalle $\Delta E_{\text{vib}} = h\nu$ (fig. 10.4).

À température ordinaire, les molécules sont encore dans l'état non excité $V = 0$, soit $E_{(\text{vib})0} = 1/2 h\nu$ (énergie à 0 Kelvin). À côté de la transition ordinaire $\Delta V = +1$, celle correspondant à $\Delta V = +2$, « interdite » par cette théorie, apparaît faiblement lorsque la bande d'absorption fondamentale est particulièrement intense (cas de la vibration d'élongation de la liaison C=O des cétones ou aldéhydes, par exemple).

■ Aucun mode de vibration de valence ne se situe au-delà de $3\,960 \text{ cm}^{-1}$ (H-F), ce qui définit la frontière entre le moyen et le proche infrarouge. Cependant pour des raisons utilitaires,

beaucoup de spectromètres actuels englobent le moyen et le proche infrarouge permettant d'aller jusqu'à $8\,000\text{ cm}^{-1}$.

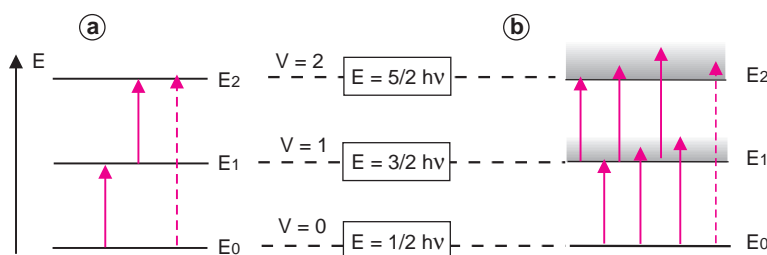


Figure 10.4 Diagramme des énergies de vibration d'une liaison.

a) Pour des molécules isolées ; b) pour des molécules en phase condensée. La transition $V = 0$ à $V = 2$ correspond à une bande harmonique de faible intensité. Compte tenu des énergies des photons dans le moyen infrarouge, on peut calculer que le premier état excité ($V = 1$) est 10^6 fois moins peuplé que l'état fondamental. Les transitions harmoniques sont exploitées dans le proche infrarouge.

10.5 LES COMPOSÉS RÉELS

Le modèle de l'oscillateur harmonique ne tient pas compte de la nature réelle des liaisons qui sont loin d'être des ressorts parfaits. k diminue si on éloigne les atomes mais, par contre, augmente fortement si on cherche à les superposer. Les modélisations plus précises font intervenir plusieurs termes correctifs dus à l'anharmonicité des oscillations observées expérimentalement.

Par ailleurs, dans le moyen infrarouge, l'énergie des photons est suffisante pour modifier les termes quantifiés E_{Vib} et E_{Rot} de la formule 10.2. On est donc en présence de spectres de vibration-rotation, c'est à dire que plusieurs dizaines de transitions de rotation distinctes accompagnent chaque transition de vibration. Il est possible d'interpréter dans le cas des molécules les plus simples l'aspect particulier des bandes d'absorption. L'expérience et la théorie ont permis d'énoncer des règles de sélection des transitions permises. Le monoxyde de carbone ou le chlorure d'hydrogène (fig. 10.5) ont été de ce point de vue largement étudiés.

La relation 10.2 conduit à définir les absorptions possibles (fig. 10.6) :

$$\Delta E_{VR} = (E_{VR})_2 - (E_{VR})_1 = \Delta E_{\text{Vib}} + \Delta E_{\text{Rot}} \quad (10.9)$$

■ Une molécule de n atomes entre lesquels s'exercent des interactions est définie par $3n$ coordonnées, appelées degrés de liberté (voir § 10.3). Comme il faut 3 coordonnées pour définir son centre de gravité (mouvement de translation de la molécule), les $3n-3$ degrés restants sont appelés degrés de liberté internes. En général il en faut 3 pour définir la rotation de la molécule entière. Tous les autres correspondent aux mouvements de vibration internes (soit $3n-6$). Une molécule avec 30 atomes aura donc 84 modes normaux de vibration, fort heureusement pas tous actifs puisqu'il doit y avoir variation du moment dipolaire. Un si grand nombre de niveaux d'énergie, auxquels s'ajoutent des combinaisons de niveaux et des harmoniques ne peut conduire qu'à des spectres complexes et uniques pour chaque type de composé.

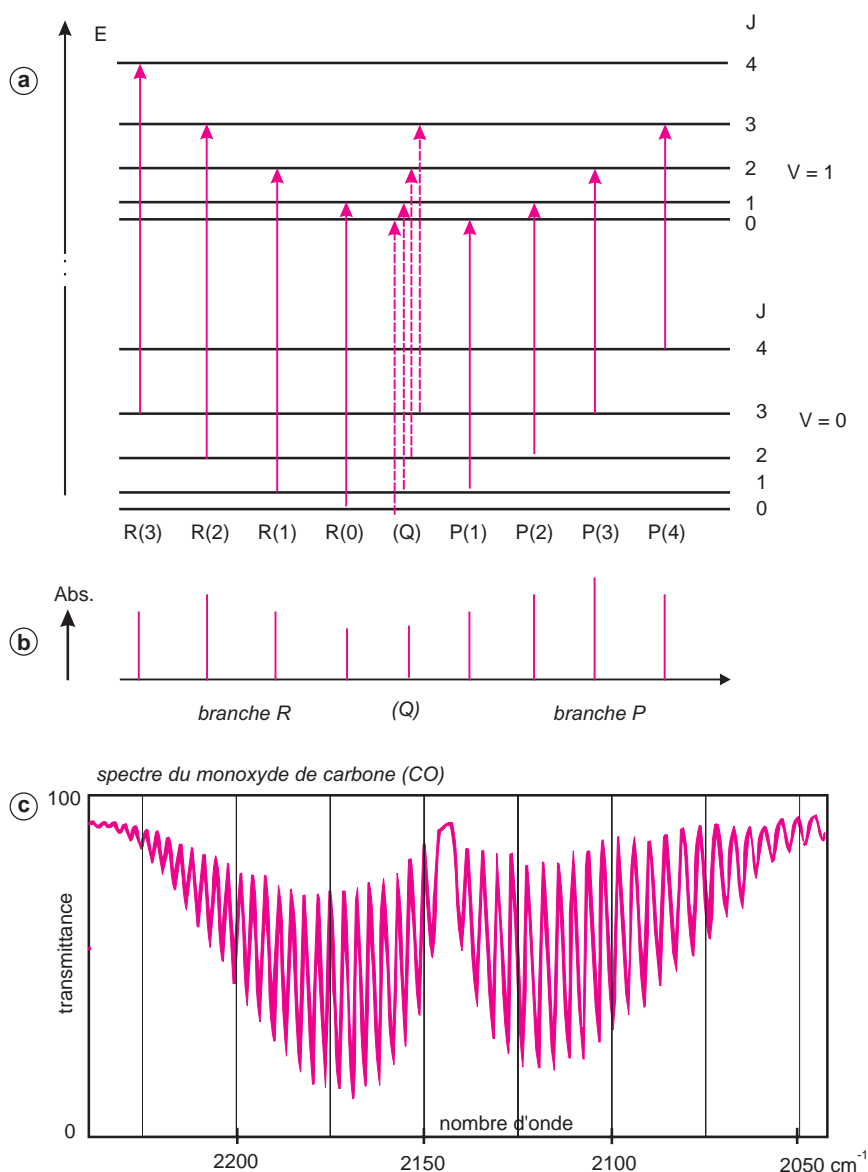


Figure 10.5 Étude de niveaux de rotation/vibration d'une molécule simple avec la traduction graphique sous forme d'un spectre de vibration/rotation. V et J sont les nombres quantiques de vibration et de rotation.

La vibration fondamentale correspond à $V = +1$ et $J = +1$. a) Une bande de vibration-rotation correspond à tous les sauts quantiques autorisés. Si l'échelle du diagramme est en cm^{-1} , les flèches correspondent aux nombres d'onde des absorptions; b) la branche R correspond à $\Delta J = +1$, et la bande P à $\Delta J = -1$. Elles sont situées de part et d'autre de la bande Q , absente du spectre (on suppose ici que $\Delta J = 0$ correspond à une transition interdite); c) en dessous, bande de vibration-rotation du monoxyde de carbone ($P = 1\,000\text{ Pa}$). Les nombreuses raies sont expliquées par les règles de sélection. L'écart entre les raies successives de rotation n'est pas constant, par suite du facteur d'anharmonicité.

10.6 BANDES CARACTÉRISTIQUES DES COMPOSÉS ORGANIQUES

L'extension des notions ci-dessus à toutes sortes de composés a été mise à profit pour utiliser le moyen infrarouge comme méthode d'analyse structurale.

Empiriquement, on a remarqué qu'il y avait une corrélation entre les positions des maxima d'absorption de certaines bandes et la présence de fonctions organiques ou de particularités de squelette dans les espèces examinées (voir tableau page 201). Cette propriété provient du fait que chaque fonction organique correspondant à un ensemble type de quelques atomes, on retrouve des caractéristiques spectrales communes à toutes les molécule dans laquelle cette fonction est présente.

Pour une liaison donnée, la constante de force k (expression 10.3) varie peu d'une molécule à une autre. De plus, le calcul montre que la masse réduite tend vers une valeur limite, propre à la fonction, dès que les masses moléculaires deviennent grandes (voir formule 10.4).

Les mouvements moléculaires les plus connus sont les vibrations d'élongation (symétrique et asymétrique) et les vibrations de déformation angulaires (fig. 10.6). En revanche, dans la partie du spectre en dessous de $1\,500\text{ cm}^{-1}$, les bandes d'absorption sont nombreuses et diffèrent avec chaque composé. Ce sont les vibrations de déformation des liaisons et de squelette qu'il est rare de pouvoir toutes interpréter.

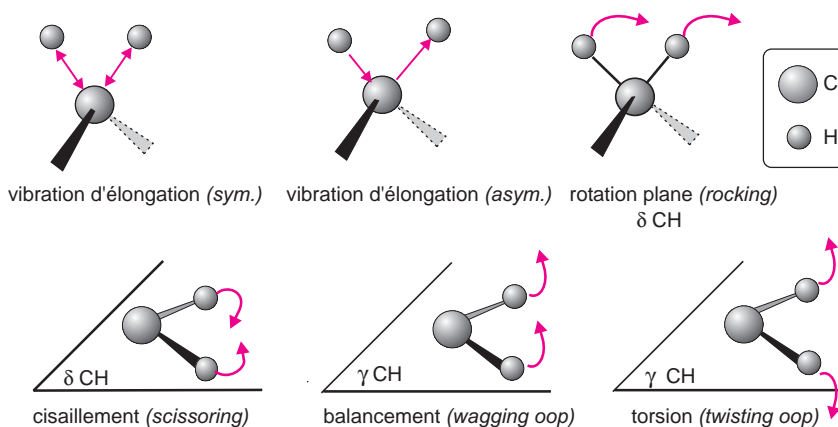


Figure 10.6 Vibrations moléculaires du CH_2 .

Vibrations caractéristiques d'élongation et de déformation, dans le plan et hors du plan (oop, « out of plane »). Dans l'infrarouge, la position et l'intensité des bandes sont modifiées par les associations entre molécules, la polarité des solvants, etc.

Pour des raisons instrumentales, la bande spectrale qui s'étend de 1 à $2,5\text{ }\mu\text{m}$ (bien qu'il n'y ait pas de limites formelles) est longtemps restée ignorée. Ce sont les progrès conjugués des détecteurs et des fibres optiques transparentes dans le proche infrarouge alliés au développement des méthodes chimiométriques qui ont permis son développement.

Les spectres se présentent souvent comme des courbes sans pics nets. Néanmoins chaque enregistrement est représentatif de l'échantillon, donc utilisable comme une empreinte. Pour les composés organiques, les bandes d'absorption du proche infrarouge ont pour origines soit les bandes harmoniques soit les bandes de combinaison des vibrations fondamentales

des liaisons CH, OH et NH (qui se situent vers $3\,000\text{--}3\,600\text{ cm}^{-1}$). Ainsi pour les composés carbonylés, les deux premiers harmoniques de la vibration fondamentale du C=O ($1\,700\text{ cm}^{-1}$) apparaissent vers $3\,400$ et $5\,100\text{ cm}^{-1}$. Les bandes de combinaison, résultant de l'interaction de deux ou plusieurs modes de vibration pour un même groupe fonctionnel, se superposent aux précédentes. L'énergie de la transition est approximativement la somme de celles qui lui ont donné naissance.

■ Le chloroforme qui absorbe à $3\,020\text{ cm}^{-1}$ et à $1\,215\text{ cm}^{-1}$ absorbera à $4\,220\text{ cm}^{-1}$ qui représente approximativement la somme des deux valeurs précédentes.

10.7 SPECTROMÈTRES ET ANALYSEURS INFRAROUGES

Les instruments se répartissent en deux catégories : les *spectromètres à transformée de Fourier* qui réalisent une analyse simultanée de toute la bande spectrale à partir de mesures interférométriques et les nombreux *analyseurs spécialisés*. Dans le proche infrarouge on trouve également encore quelques *spectromètres de type dispersif*.

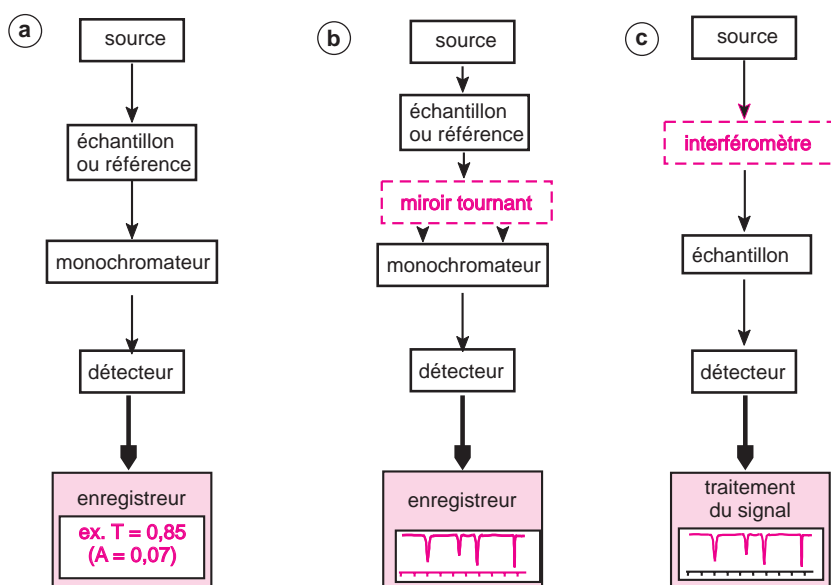


Figure 10.7 Diagramme des spectromètres et analyseurs dans l'infrarouge.

a) Analyseur simple faisceau, comportant un monochromateur fixe ou un filtre, utilisé lorsqu'une mesure à longueur d'onde unique suffit ; b) spectromètre double faisceau de type dispersif. Contrairement aux spectrophotomètres de l'UV/Visible, l'échantillon, placé avant le monochromateur, est soumis en permanence à tout le rayonnement de la source. L'énergie des photons dans ce domaine est insuffisante pour briser les liaisons et, par cela même, dégrader l'échantillon ; c) modèle simple faisceau à transformée de Fourier.

La première catégorie est basée sur l'emploi d'un interféromètre de type Michelson ou assimilé, associé à un microprocesseur spécialisé pour calculer le spectre sous forme numérique tandis que la seconde utilise des filtres ou un monochromateur installés dans des montages particuliers en fonction de la plage spectrale étudiée (fig. 10.7).

■ Pendant longtemps, les spectromètres du moyen infrarouge ont été construits sur le principe des appareils double faisceau. Ce montage optique assez complexe qui est resté utilisé dans l'UV/Visible, donne progressivement, en temps réel, le spectre de l'échantillon par la mesure pour chaque longueur d'onde, de la transmittance calculée en comparant les intensités lumineuses en provenance de deux parcours optiques distincts, dont l'un sert de voie de référence et l'autre passe par l'échantillon. À cette fin, la lumière issue de la source est séparée par un jeu de miroirs en deux faisceaux semblables dont l'un se dirige vers le compartiment échantillon et l'autre vers le compartiment de référence. Pour chaque petit intervalle de longueur d'onde, défini par le monochromateur, la lumière ayant suivi chacune des deux voies arrive alternativement sur le détecteur par effet d'un miroir tournant au rythme d'une dizaine de fois par seconde. Le rapport des signaux obtenus pratiquement au même instant, correspond à la transmittance pour cette longueur d'onde.

10.7.1 Spectromètres à transformée de Fourier (IRTF)

Les spectromètres infrarouges à transformée de Fourier correspondent à un montage optique à simple faisceau qui comporte comme pièce essentielle un interféromètre — souvent de type Michelson — placé entre la source et l'échantillon (fig. 10.7c).

Les radiations issues de la source polychromatique viennent frapper une *séparatrice*, constituée d'un film semi-transparent de germanium déposé sur une lame de KBr. Ce dispositif permet de générer deux faisceaux dont l'un se dirige vers un miroir fixe et l'autre vers un miroir mobile dont on fait varier la distance à la séparatrice. Ces deux faisceaux, recombinaison ensuite sur le même trajet, traversent l'échantillon avant de venir frapper le détecteur qui reçoit l'intensité lumineuse globale. C'est un procédé de multiplexage appliqué ici au domaine des signaux optiques. Le cœur de l'interféromètre de Michelson est le miroir mobile, seule pièce en mouvement, qui oscille au cours du temps entre deux positions extrêmes. Lorsque sa position est telle que les chemins empruntés par les deux faisceaux ont même longueur, la composition de la lumière sortant de l'interféromètre est identique à la lumière qui y entre. Par contre, lorsque le miroir mobile quitte cette position particulière, la lumière sortante a une composition spectrale qui dépend du déphasage entre les deux voies : le signal transmis au cours du temps par le détecteur est traduit sous forme d'un *interférogramme*, $(\text{Int. totale}) = f(\delta)$, δ représentant la différence de trajet optique entre les deux voies (fig. 10.8). La gestion du banc optique et l'acquisition des données est réalisée par une interface électronique spécifique. Pendant le déplacement du miroir, un convertisseur ADC échantillonne l'interférogramme sous forme de milliers de points. Chacune de ces valeurs correspond à une position du miroir et représente l'intensité globale qui a traversé l'échantillon. Il s'agit formellement du second membre d'une formidable équation linéaire dont les termes correspondent aux intensités des n différentes longueurs d'onde (choisies en nombre fini) pour la position considérée du miroir et après absorption par l'échantillon. À partir de ces milliers de valeurs, un microprocesseur spécialisé exécute, en moins de temps qu'il ne faut pour le dire, le calcul d'une matrice géante en suivant un algorithme particulier de transformée de Fourier rapide, dû à Cooley, pour conduire aux amplitudes de chaque longueur d'onde de la bande spectrale étudiée. Compte tenu d'un facteur de résolution imposé par la méthode de calcul, on obtient la représentation classique du spectre $I = f(\lambda)$ ou $I = f(\bar{\nu})$. Selon le théorème de Nyquist, il faut au moins deux points par période pour retrouver, par calcul, une longueur d'onde donnée du spectre. Pour obtenir le spectre d'un

échantillon, équivalent à celui obtenu avec un appareil double faisceau, on enregistre deux spectres des intensités transmises : le premier, *sans échantillon* (fond d'absorption, *background* en anglais) et le second, *avec l'échantillon*. Le spectre traditionnel, en % de T , est issu de la comparaison des deux spectres précédents (fig. 10.9).

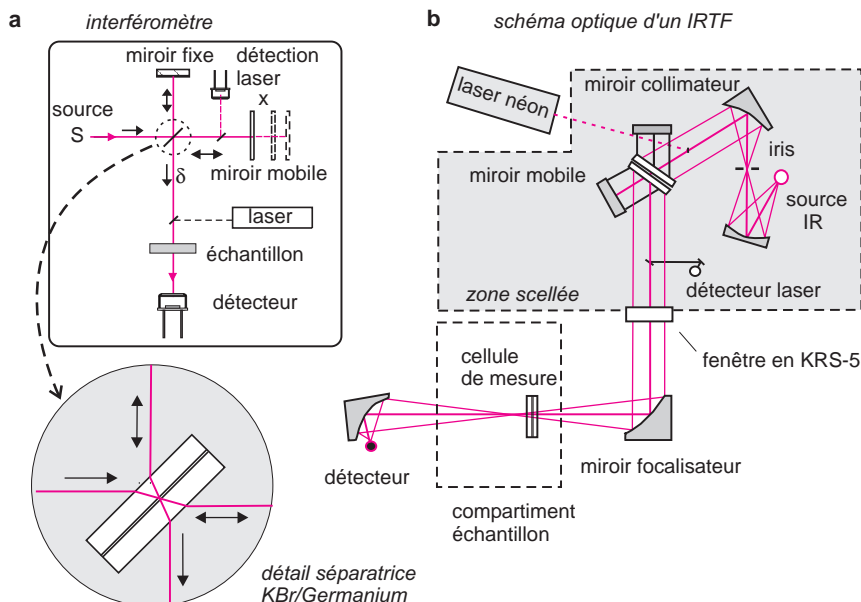


Figure 10.8 Montage optique d'un appareil à transformée de Fourier.

a) Interféromètre de Michelson 90° avec, en cartouche, quelques détails au niveau de la séparatrice ; b) diagramme optique d'un spectrophotomètre à simple faisceau (dessin du modèle 8 300 de la société Shimadzu). Un laser He/Ne de faible puissance est utilisé comme étalon interne (632,8 nm) afin de repérer avec précision la position du miroir mobile par une méthode interférentielle (ce second interférogramme sinusoïdal suit le même trajet optique).

■ Le mathématicien français J.B. Fourier (1768-1830) n'a jamais été aussi célèbre que depuis l'invasion des micro-ordinateurs. Le principe de ses calculs, publiés dans un traité sur la propagation de la chaleur en 1808, est appliqué dans de nombreux logiciels scientifiques pour le traitement des spectres (acoustique, optique) et des images. On dit qu'il élaborait ces calculs quand l'armée Napoléonienne le chargea d'améliorer les dimensions des canons.

D'une manière générale, une transformée est une opération mathématique qui permet de passer d'un domaine de mesure à un autre (par exemple du temps, à la longueur d'onde).

Cette méthode d'obtention des spectres, également adaptée au proche IR, a été mise en œuvre par tous les constructeurs de spectromètres (fig. 10.10) ; elle présente plusieurs avantages :

- la fente d'entrée est remplacée par un iris ce qui fournit un meilleur signal au détecteur qui reçoit *plus d'énergie* (avantage du multiplexage) ;
- le rapport signal final/bruit de fond est *bien supérieur* à celui de la méthode séquentielle puisqu'il peut être amélioré par accumulation des signaux des balayages successifs (« avantage de Fellgett ») ;

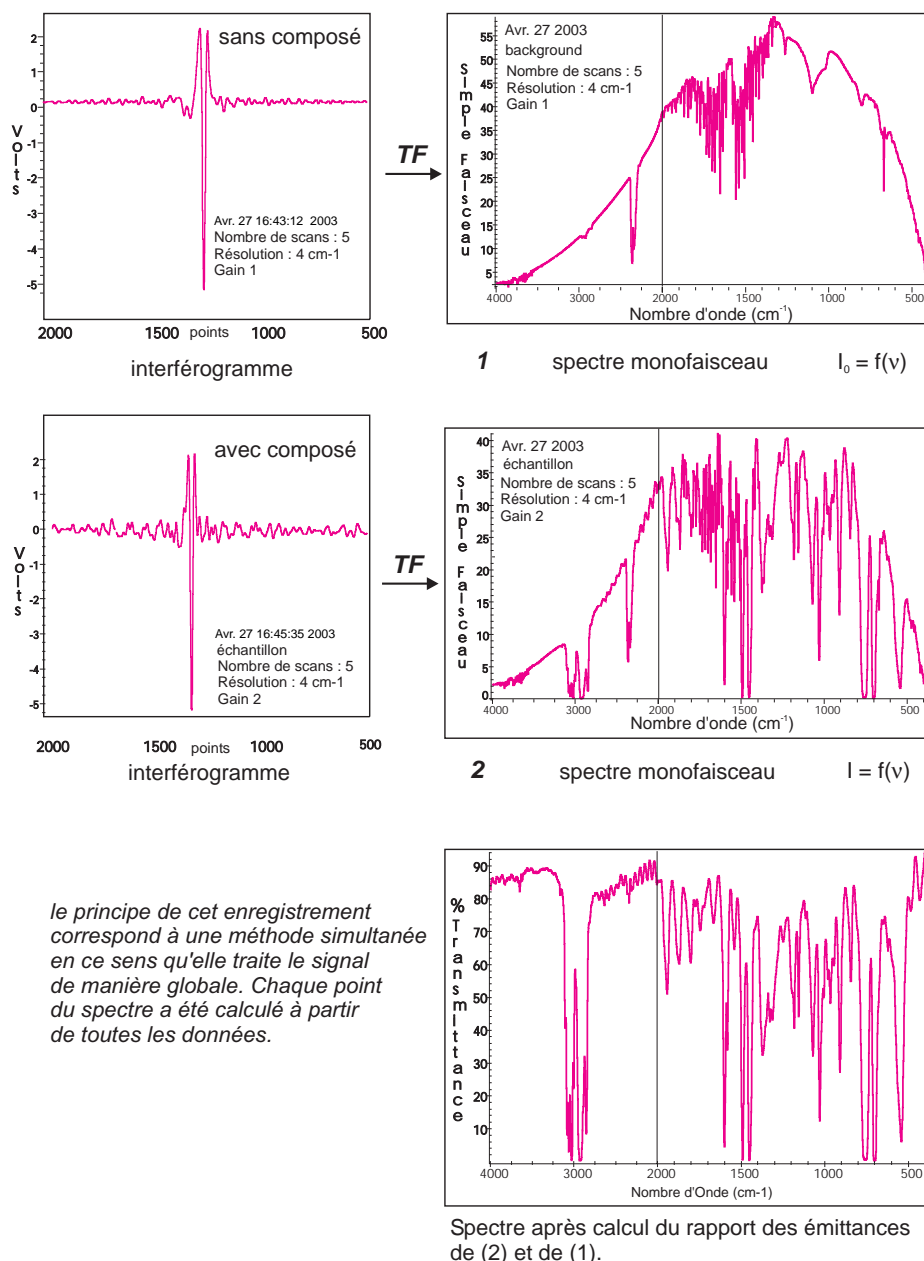


Figure 10.9 Séquence d'obtention d'un spectre pseudodouble-faisceau avec un spectromètre infrarouge à transformée de Fourier.

L'appareil enregistre et met en mémoire deux spectres qui représentent les variations de I_0 (le blanc) et de I (l'échantillon) en fonction du nombre d'onde (ce sont les spectres en émittance 1 et 2); puis il calcule le spectre conventionnel, identique à celui que donne n appareil de type double faisceau, en effectuant le rapport $T = I/I_0$, pour chaque nombre d'onde. L'absorption atmosphérique (CO_2 et H_2O) se trouve ainsi éliminée. Les illustrations correspondent à la réalisation d'un spectre d'un film de polystyrène.

- les longueurs d'onde sont calculées *avec une grande précision* ce qui permet des comparaisons de spectres ;
- la résolution est meilleure et constante sur tout le domaine étudié.

Il existe une autre façon de créer un retard sur un des chemins optiques pour obtenir un interférogramme. Le principe repose sur le passage de la lumière à travers un cristal biréfringent, pour constituer un interféromètre à polarisation.

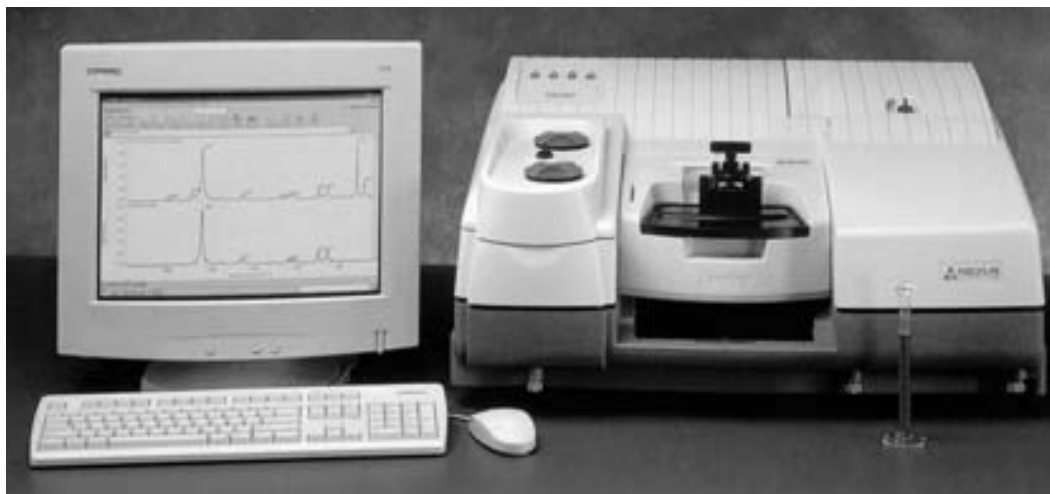


Figure 10.10 Spectrophotomètre infrarouge à transformée de Fourier.

Le banc optique du spectromètre est piloté par un logiciel (Modèle NEXUS reproduit avec l'autorisation de la société Nicolet).

10.7.2 Analyseurs infrarouges

De nombreux appareils de taille réduite, autonomes, utilisés pour la protection du personnel et des applications ciblées, dont les contrôles d'alcoolémie faits au moyen des éthylomètres, sont basés sur des mesures d'absorbance dans le moyen ou le proche infrarouge. Leur conception est beaucoup plus simple que celle des spectrophotomètres précédents. Prévus pour évaluer des absorbances très faibles ($1 \cdot 10^{-5}$), ils peuvent cependant mesurer de manière fiable des concentrations de l'ordre du ppm pour des gaz tels le mono ou dioxyde de carbone, l'ammoniac, le méthanal, l'éthanol, le méthane... (en tout une centaine de gaz ou composés volatils). La source peut-être une diode laser qui émet à une longueur d'onde précise ou un simple filament recouvert de silice (cas des éthylomètres). Le détecteur est du type pyroélectrique. Les mesures des taux de mono- et dioxyde de carbone des gaz d'échappement automobile sont établies par cette méthode. On mesure l'absorbance vers $2\,170\text{ cm}^{-1}$ pour le CO (cf. fig. 10.5) et à $2\,364\text{ cm}^{-1}$ pour le CO₂ (fig. 10.11 et 10.12). Pour l'éthanol on mesure l'absorbance caractéristique des alcools primaires à $1\,050\text{ cm}^{-1}$. Ces *colorimètres de l'infrarouge* sont concurrents des appareils basés sur des principes différents (détection ampérométrique, cf. chapitre 20).

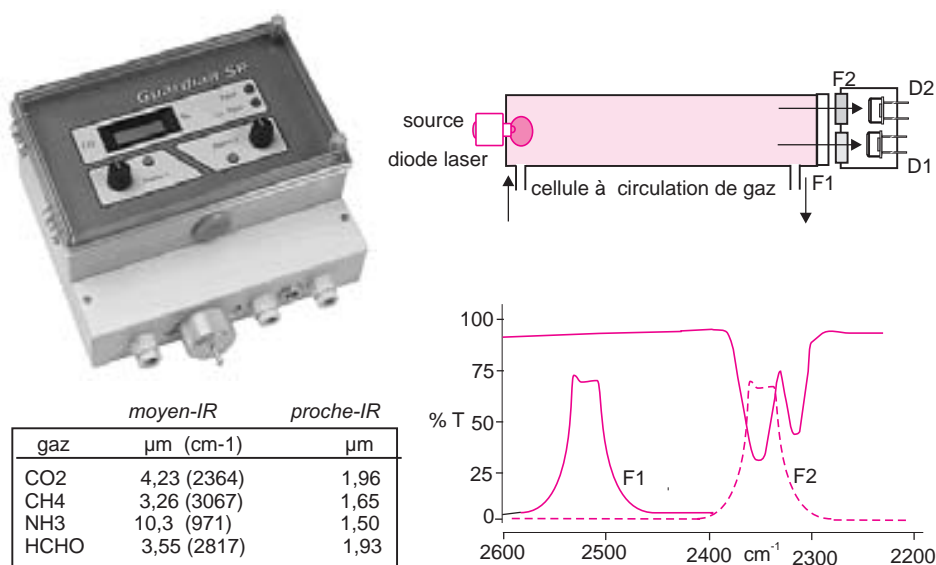


Figure 10.11 Analyseur non dispersif pour le dosage du CO₂ en milieu gazeux.

Ce montage est représentatif de beaucoup de détecteurs portables. La sélectivité est assurée par un filtre optique adapté (F2) et par une membrane à l'entrée de la cellule qui ne laisse passer que le gaz à détecter. Le montage comporte un second filtre (F1) situé dans une zone de non absorption, pour permettre de calculer la transmittance. Sur le dessin sont figurés les bandes passantes des 2 filtres et le spectre en transmittance d'un gaz, ici le CO₂. Les détecteurs sont des thermistors (reproduit avec l'autorisation de la société Edinburgh Sensors, GB). En bas tableau résumant le choix de longueurs d'ondes dans le moyen-IR et le proche IR pour quelques gaz.

10.8 SOURCES ET DÉTECTEURS DANS LE MOYEN IR

10.8.1 Sources lumineuses

Dans l'infrarouge les sources se présentent sous la forme, soit d'un gros filament (fig. 10.13), soit d'un bâtonnet creux de 3 à 4 cm de long, composé d'un mélange d'oxydes de zirconium et de terres rares (source de Nernst, $\varnothing = 3$ mm) chauffé par une résistance intérieure, soit d'un barreau de carbure de silicium (modèle Globar, nom commercial dérivé de *glowing-bar*). Ces sources sont alimentées sous une tension de quelques volts. Portées vers 1 500 °C, sans enveloppe protectrice, elles dissipent une puissance de l'ordre d'une centaine de watts, en émettant dans un large domaine allant du visible à l'infrarouge thermique en passant par un maximum pour $\lambda = 3\,000/T$ (λ en micromètres et T en Kelvin – adaptation de la loi de Stefan). L'intensité rayonnée varie énormément en fonction de la température de la source.

10.8.2 Détecteurs

La détection des photons du domaine de l'infrarouge a pendant longtemps été difficile, cause principale de la médiocre sensibilité des premiers spectrophotomètres. Le principe repose sur l'effet thermique des radiations. Suivant le type d'application ou d'instrument, on utilise des thermistors, thermocouples, thermopiles ou autres capteurs quelquefois astucieux (fig. 10.12b). Pour les spectromètres à transformée de Fourier, le détecteur, qui doit pouvoir

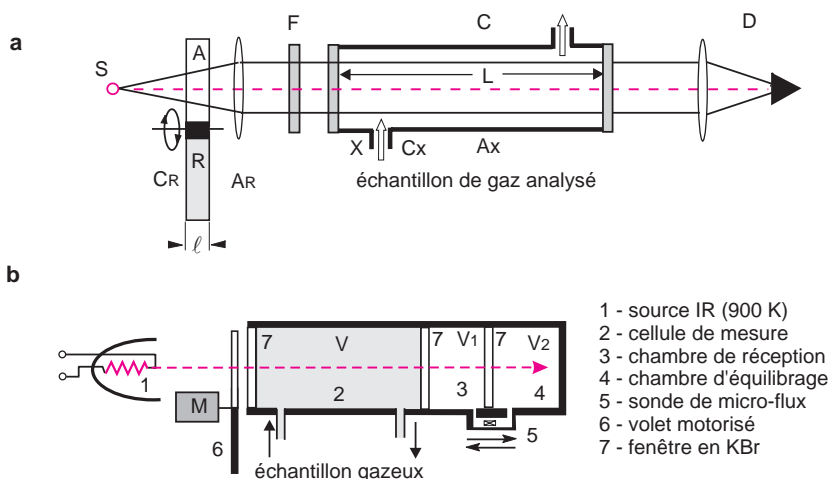


Figure 10.12 Deux modèles d'analyseurs de gaz de type simple faisceau.

a) La lumière issue de la source S , traverse d'abord un montage à barillet servant de modulateur. Il comporte deux capsules l'une R remplie à 100 % avec du gaz à détecter et l'autre A avec un gaz neutre (diazote). Ensuite la lumière traverse un filtre interférentiel F choisi en fonction de la longueur d'onde de mesure, puis la cellule C contenant l'échantillon. Quand la cellule R est sur le parcours, on obtient une absorbance supplémentaire connue qui permet de déduire celle due au gaz recherché (et des interférents) dans la cellule de mesure (adapté d'un appareil de la société Servomex, GB) ; b) la lumière de la source, après avoir traversé la cellule de mesure atteint la cellule V_1 contenant le gaz de référence (pour doser CO par exemple, V_1 et V_2 contiennent ce gaz). La mesure du flux gazeux, par un capteur de microdébit, circulant entre V_1 et V_2 est une indication des variations de pression entre ces deux chambres, donc du rayonnement infrarouge absorbé par le gaz présent dans V_1 : le rayonnement atteignant V_1 sera d'autant plus atténué que l'échantillon dans la cellule de circulation V contiendra de ce même gaz. Un disque modulateur sert à hacher le flux lumineux pour avoir un signal pulsé (adapté d'un appareil de la société Siemens).

suivre les modulations rapides de l'intensité lumineuse, est un *cristal pyroélectrique* ou un *semi-conducteur* du type photodiode (fig. 10.14). Peu encombrants et légers, ils ont une faible inertie thermique et une réponse instantanée et linéaire.

Le *détecteur à effet pyroélectrique* le plus souvent rencontré comporte un monocristal de sulfate de triglycine deutériée (DTGS) ou de tantalate de lithium (LiTaO_3), placé en sandwich entre deux électrodes, dont l'une, semi-transparente, reçoit l'impact du faisceau optique. Le cristal se polarise proportionnellement au rayonnement reçu. Il se comporte comme un condensateur et ne répond qu'aux variations de température.

Le *détecteur à semi-conducteur* comporte une photodiode qui est utilisée soit en mode photovoltaïque (sans tension de bias) soit en mode photoconducteur (en appliquant un bias). Il contient une jonction P-N qui sous l'effet du rayonnement libère des paires électron/trou qui font apparaître une ddp mesurable dans un circuit ouvert. Ce type de détecteur est constitué, pour le moyen infrarouge, d'un alliage de mercure cadmium tellure (MCT) ou d'indium/antimoine (In/Sb) déposé sur un support inerte, et pour le proche infrarouge, de sulfure de plomb ou d'un alliage indium/gallium/arsenic. La sensibilité est améliorée lorsque ces détecteurs sont refroidis à la température de l'azote liquide (77 K).

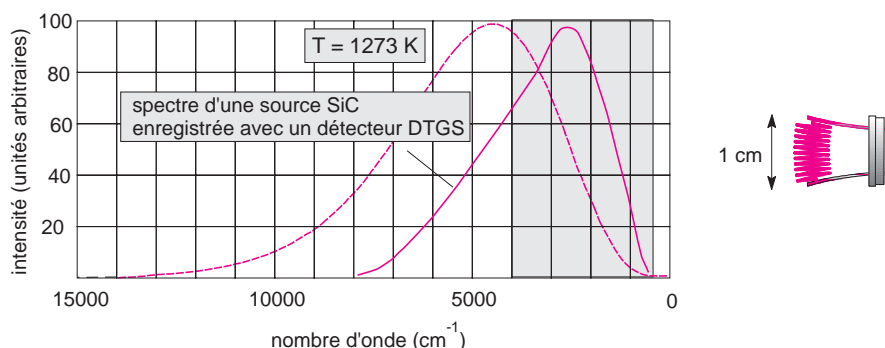


Figure 10.13 Spectre d'émission typique d'une source du moyen infrarouge et dessin d'une source simple.

En pointillés est représentée la courbe théorique d'émission d'une source parfaite (rayonnement du corps noir, à la température de 1 000 °C). Suivant le modèle de source, de séparatrice, de détecteur, on enregistre une courbe expérimentale de réponse qui diffère sensiblement de la courbe théorique. On remarquera en particulier qu'entre 4 000 et 400 cm^{-1} . L'intensité lumineuse est divisée par un facteur de 10 environ. Les sources ont une durée de vie de plusieurs années.

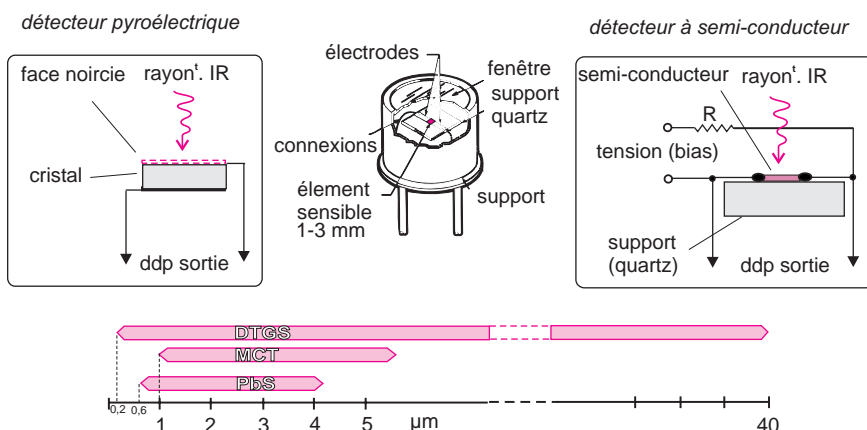


Figure 10.14 Détecteurs dans l'infrarouge.

Principe de fonctionnement des détecteurs pyroélectrique et à semi-conducteur. Au centre, aspect général du détecteur et de son boîtier. En bas, plage d'utilisation des principaux détecteurs.

10.9 EXAMEN DES ÉCHANTILLONS

Les spectres sont acquis à partir d'échantillons observés soit par transmission, soit par réflexion. Ce second procédé, devenu courant dans l'infrarouge est à l'origine de plusieurs techniques pour l'examen de toutes sortes d'échantillons solides, gazeux et de solutions aqueuses.

10.9.1 Matériaux optiques

Les matériaux optiques traditionnels utilisés dans le visible ou le proche infrarouge deviennent opaques dans le moyen infrarouge. Pour les parois des cellules ou les fenêtres des

détecteurs, on doit donc utiliser d'autres matériaux cristallisés ou amorphes, chacun ayant sa plage spectrale d'utilisation. On en dénombre une bonne douzaine. Les plus courants sont le chlorure de sodium (NaCl) et le bromure de potassium (KBr) déjà signalés. Comme ils sont fragiles et solubles dans l'eau, on leur préfère quelquefois l'iodure de césium (CsI, transparent jusqu'à 200 cm^{-1}), le chlorure d'argent (AgCl), le KRS-5 (bromoiodure de thallium) et même le diamant, substances dures et insolubles, malheureusement plus chères. Signalons enfin les AMTIR (*Amorphous Material Transmitting Infrared Radiation*), verres composés de germanium, d'arsenic et de sélénium (ex. $\text{Ge}_{33}\text{As}_{12}\text{Se}_{55}$).

10.9.2 Procédés par transmission

► *Les gaz*, dont les absorbances sont faibles, nécessitent des cellules pour lesquelles le trajet optique peut être très grand. Il est au minimum de quelques centimètres (fig. 10.15) mais il peut atteindre plusieurs centaines de mètres, par le jeu de multiples réflexions du faisceau infrarouge sur des miroirs internes à la cellule. Le volume de la cellule devient alors important (0,2 L).

En revanche la technique couplée CPG/IR fait appel à des cellules à gaz filiformes (*light pipes*) dont le volume ne dépasse pas quelques dizaines de μL ($\ell = 10\text{ cm}$ et $\varnothing < 1\text{ mm}$). La paroi latérale interne est dorée, pour provoquer ici encore des réflexions multiples.

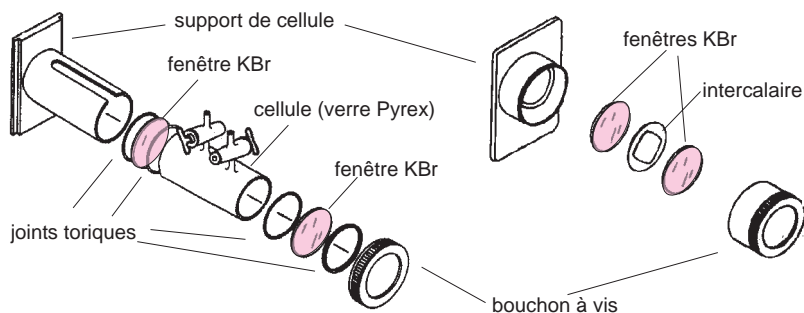


Figure 10.15 Cellules dans le moyen infrarouge.

Vues éclatées d'une cellule à gaz à trajet optique direct et d'une cellule simple pour films liquides (reproduit avec l'autorisation de la société SpectraTech). Cette conception classique des cellules démontables pour le moyen infrarouge est due à la nature des matériaux choisis pour les fenêtres. Dans le proche infrarouge, par contre, les cellules sont en quartz comme dans l'UV-VIS.

► *Les liquides* sont étudiés, du moins pour les applications qualitatives, avec des cellules à parois démontables comportant deux disques de NaCl ou de KBr entre lesquels on écrase modérément une goutte de l'échantillon pour en faire un film. Pour les dosages, on prend, selon la longueur d'onde de la mesure, soit des cuves en quartz *Infrasil* (trajet optique de 1 à 5 cm), soit des cuves en matériaux conventionnels, dont l'épaisseur est contrôlée (fig. 10.15).

► *Les solides* sont plus difficiles à étudier.

Si le solide peut être mis en solution, on est ramené au cas général de l'examen d'un liquide, sachant bien qu'il n'existe malheureusement pas de solvant transparent sur toute l'étendue du moyen infrarouge. Ce procédé permet de faire des mesures quantitatives dans les parties du spectre pour lesquelles le solvant n'absorbe pas.

Si le solide peut être réduit en poudre fine (idéalement en particules de moins de 1 μm), on en disperse quelques milligrammes dans un milieu qui joue le rôle de matrice, tel une huile de paraffine (encore appelée NUJOL) ou du bromure de potassium anhydre (KBr). Cela permet à la fois de diminuer la forte dispersion optique causée par l'interface particule/air et de maintenir le solide sur le trajet optique de l'appareil. On limite d'autant plus les pertes de lumière par diffusion, que le solide a été réduit en poudre plus fine.

■ Le NUJOL ne présente que trois bandes principales d'absorption en dehors desquelles le spectre de l'échantillon est exploitable. On peut compléter ce premier spectre par un second réalisé dans l'hexachlorobutadiène, en revanche transparent dans les domaines où la paraffine absorbe. Quant au KBr, on le broie avec le solide dans un mortier en agate. Ce mélange est ensuite comprimé sous forme d'un petit disque translucide à l'aide d'une presse hydraulique ou manuelle (pression de 5 à 8 t/cm²).

10.9.3 Procédés par réflexion pour les échantillons solides

L'obtention de spectres par réflexion est une alternative aux procédés précédents (fig. 10.17). Les dispositifs correspondants sont basés sur la *réflexion totale atténuée* ou la *réflexion spéculaire* ou la *réflexion diffuse* et ne sont utilisables qu'avec les IRTF, sachant que les spectres obtenus en lumière réfléchie doivent subir des corrections au moyen de logiciels pour les rendre comparables aux spectres par transmission.

■ Lorsqu'un faisceau lumineux arrive à la surface d'un milieu dont l'indice de réfraction est différent, il peut subir, suivant l'angle d'incidence et le sens de la variation de l'indice, soit une réflexion totale comme sur un miroir, soit une réflexion atténuée après avoir, en partie, pénétré dans le second milieu (quelques micromètres seulement pour le moyen infrarouge). La composition spectrale du faisceau réfléchi dépend de la façon dont varie l'indice de réfraction du matériau et du composé étudié avec la longueur d'onde.

► **Accessoire de Réflexion Totale Atténuée (ATR).** On fait subir au faisceau optique une ou plusieurs réflexions à l'interface entre l'échantillon et un matériau transparent dans le domaine de longueur d'onde choisi, d'indice de réfraction n élevé tel le germanium ($n = 4$), l'AMTIR ($n = 2,5$), le diamant ($n = 2,4$) ou le KRS -5 ($n = 2,4$) sur lequel il a été déposé (fig. 10.16 et 10.17a). Si l'angle d'incidence est supérieur à l'angle critique, la lumière ne pénètre que faiblement dans l'échantillon à une profondeur de quelques dixièmes de micromètre environ qui dépend de la longueur d'onde, des indices de réfraction du cristal et de l'échantillon et de l'angle d'incidence. On dit qu'on est en présence d'une *onde évanescente*. La succession de plusieurs réflexions *totales mais atténuées* de ce type conduit à un trajet optique effectif comparable à celui qui aurait été obtenu par transmission. On corrige néanmoins le spectre pour tenir compte de la profondeur de pénétration dont on sait qu'elle augmente avec la longueur d'onde.

Ce procédé est devenu indispensable par suite de sa polyvalence, pour les échantillons solides, les poudres, les liquides aqueux et même les gaz. Dans certains dispositifs le cristal est plongé au sein du composé à analyser.

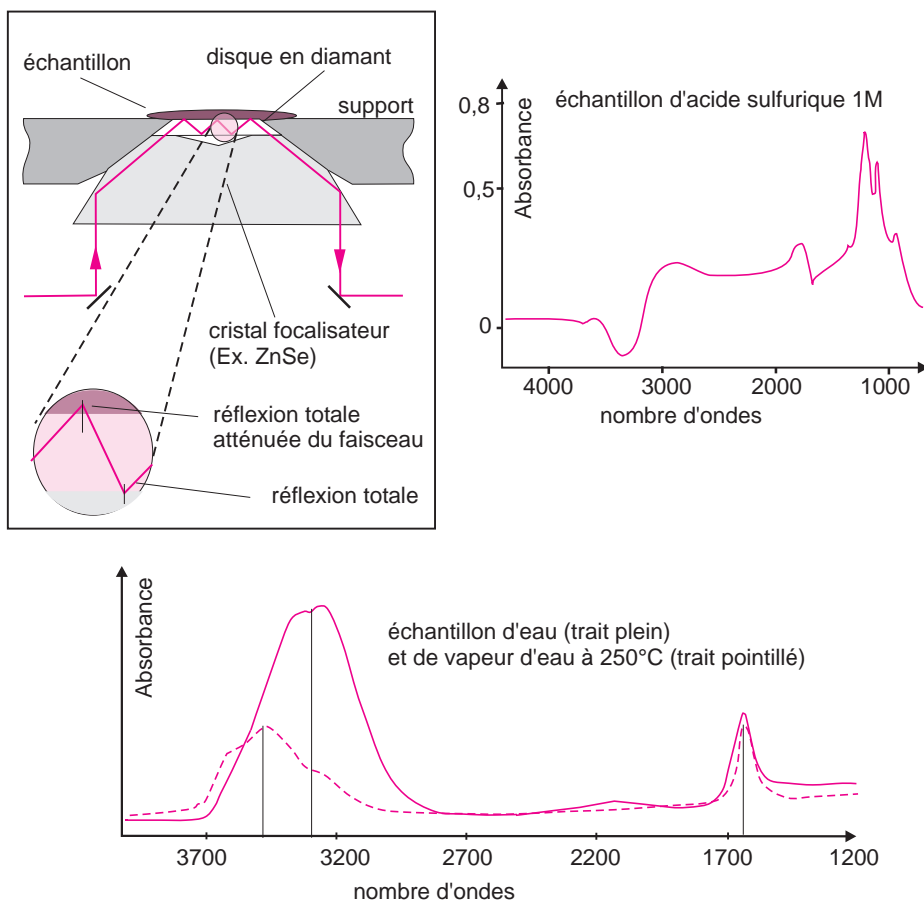


Figure 10.16 Dispositif ATR à trois réflexions et exemples de spectres.

Le petit disque en diamant (diamètre 0,75 mm) permet d'isoler l'échantillon examiné du cristal de ZnSe. Sa dureté et son inertie chimique le rendent apte à l'examen de toutes sortes d'échantillons durs que l'on appuie à sa surface ou contenant de l'eau. À titre d'exemples sont reproduits deux spectres obtenus avec un tel dispositif. Spectre obtenu à partir d'une goutte d'acide sulfurique (H_2SO_4 1M) déposée comme échantillon (reproduit avec l'autorisation de la société SensIR). Spectre de l'eau à 25 °C et de la vapeur d'eau surchauffée (250 °C) (Intl. Lab. 32,(2), 2002).

■ **Sondes à fibres optiques** – La technique ATR se prête à l'étude d'échantillons à distance du banc optique de l'appareil par emploi de fibres optiques adéquates, c'est-à-dire transparentes dans l'infrarouge sur une distance de quelques mètres. Elles se prêtent notamment à la réalisation de sondes immersives dans le produit à analyser, ce qui permet des analyses rapides de contrôle dans un environnement difficile ou agressif.

➤ **Accessoire de Réflexion Spéculaire.** Il est réservé aux échantillons réfléchissant un minimum de lumière (films de polymères, vernis, certains revêtements...). Cet accessoire mesure la *réflectance*, c'est-à-dire la lumière réfléchie par l'échantillon dans une direction d'observation symétrique de la direction incidente (fig. 10.17b). Les radiations recueillies ressemblent partiellement à la lumière incidente en partie absorbée. Elles traduisent surtout les variations d'indice de réfraction du composé en fonction de la longueur d'onde.

En comparant, après enregistrement, pour chaque longueur d'onde, la réflexion spéculaire I de l'échantillon à la réflexion totale I_0 obtenue en remplaçant l'échantillon par un miroir d'aluminium, l'appareil calcule le spectre de réflectance $R = I/I_0 = f(\lambda)$. Enfin, en appliquant à ce spectre une transformation mathématique dite de Kramers-Kronig (K-K), on aboutit à un spectre calculé, présenté en pseudo-absorbance, quasiment identique à celui qu'on obtiendrait par transmission (fig. 10.17b).

- **Accessoire de Réflexion Diffuse.** Il s'agit d'un dispositif comportant un agencement de miroirs destiné à recueillir une partie de la lumière diffusée par l'échantillon finement dispersé au préalable dans du KBr en poudre (fig. 10.17 c). Par comparaison avec un enregistrement de référence obtenu à partir de KBr pur, suivie d'une correction mathématique dite de Kubelka-Munk, on obtient, ici encore, un spectre comparable à un enregistrement issu d'un procédé classique par transmission. Plus long de mise en œuvre cette technique est pratiquement abandonnée pour cette raison.

La figure 10.18 compare ces trois approches à partir de deux composés organiques.

10.10 SPECTROSCOPIE D'IMAGERIE CHIMIQUE

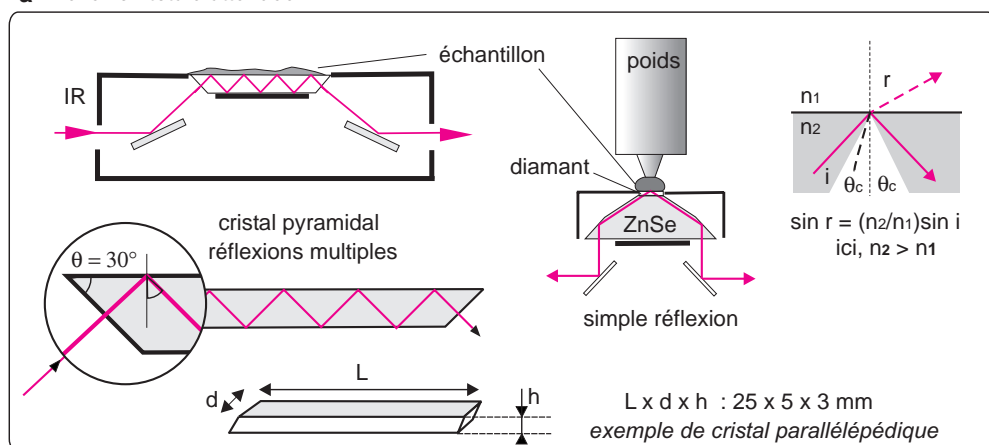
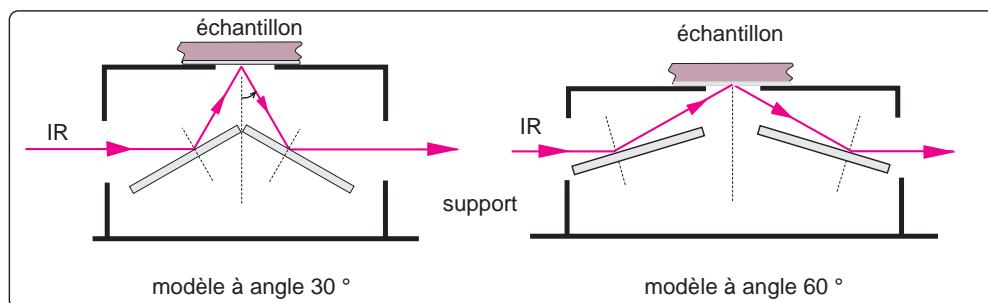
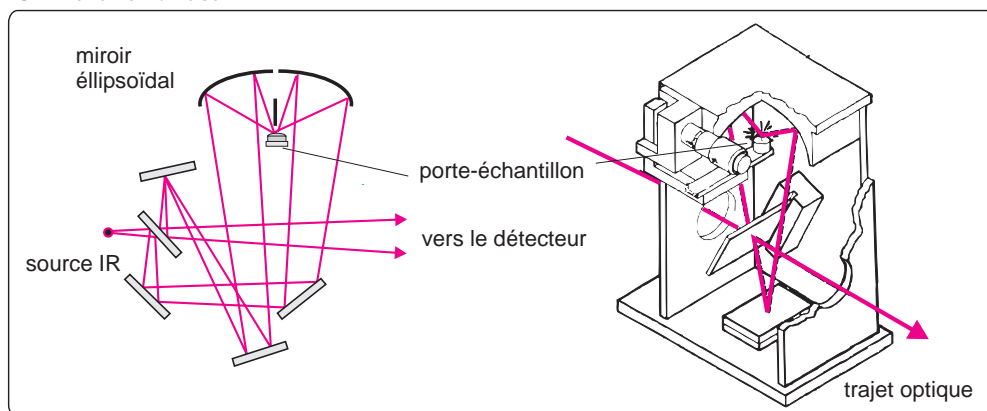
La grande sensibilité des détecteurs autorise l'étude par transmission ou réflexion de petits échantillons, tels ceux qui peuvent être examinés sous le champ d'un microscope optique. La focalisation du faisceau sur une zone de quelques micromètres seulement permet de faire une cartographie liée à la composition d'échantillons présentant une microstructure. L'appareillage est composé d'un spectromètre couplé à un microscope d'observation (fig. 10.19).

■ Beaucoup de composés industriels ou naturels se présentent comme des mélanges solides hétérogènes. Les méthodes d'analyse traditionnelles menées à partir d'échantillons de ces matériaux conduisent à des valeurs moyennes concernant la **composition atomique** dont on ne peut se satisfaire dans tous les cas. La spectroscopie réalisée ponctuellement permet au contraire de connaître la **distribution** des différents constituants et même la **nature des molécules** en chaque point de la composition. On pourra par exemple dans un comprimé à usage de médicament étudier la dispersion de l'agent actif dans l'excipient, ou évaluer les impuretés dans un aliment pour bétail. Les méthodes statistiques et chimiométriques PCA et PLS sont alors très utiles.

10.11 ARCHIVAGE DES SPECTRES

Pour occuper moins de place en mémoire que le spectre original, on utilise des logiciels qui font subir aux points expérimentaux un traitement mathématique de normalisation et de *dérésolution* pour les remplacer par un nombre plus petit de valeurs calculées (un point calculé, par exemple, tous les 4 ou 2 cm^{-1}) qui permettront de redonner une image correcte du spectre de départ par l'opération inverse.

Les constructeurs de spectromètres ont adopté un format de fichier commun aux divers appareils appelé JCAMP.DX (*Joint Committee of Atomic Molecular and Physical Data*). Il conserve toutes les valeurs numériques du spectre d'origine, ainsi que des renseignements sur le spectre, stockés dans un fichier ASCII normalisé. Ce format a l'avantage de permettre tous les algorithmes de comparaison entre les spectres pour l'identification ultérieure.

a réflexion totale atténuée**b** réflexion spéculaire**c** réflexion diffuse**Figure 10.17** Accessoires permettant l'étude des échantillons par réflexion.

a) dispositifs ATR (réflexion totale atténuée) avec cristal pyramidal pour réflexions multiples et modèle à une seule réflexion pour micro-échantillons solides (l'application d'un poids permet d'améliorer le contact de l'échantillon sur le cristal de forme arrondie). Formule de base et notion d'angle critique; b) dispositif par réflexion spéculaire. Parcours optique dans un dispositif à angle fixe de 30° pour les échantillons très réfléchissants et de 60° dans le cas contraire; c) schéma optique d'un dispositif pour réflexion diffuse et dessin à vue d'une réalisation Spectra-Tech.

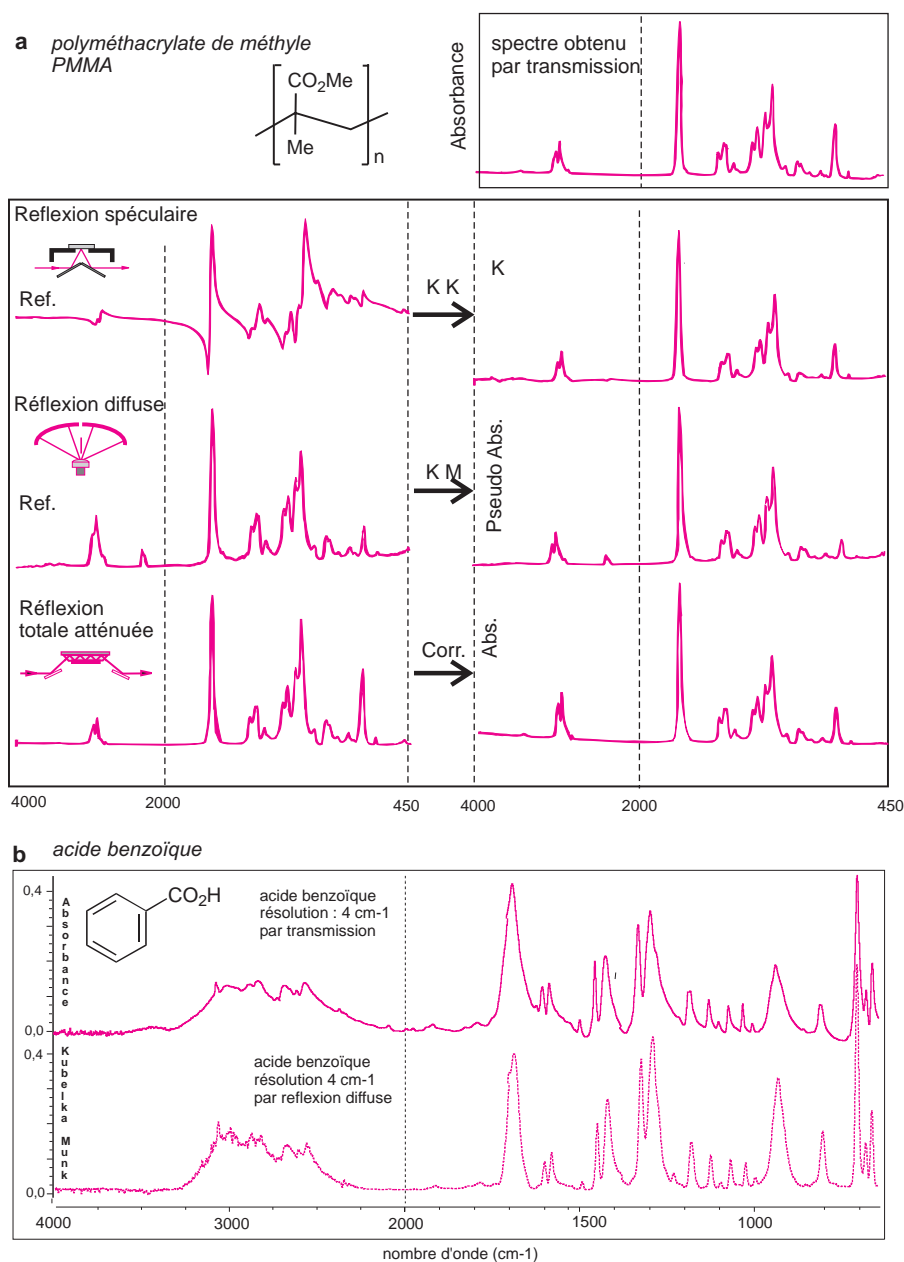


Figure 10.18 Spectres en réflexion.

a) À partir d'un échantillon de plexiglas, on a réuni les trois types de réflexions. A gauche les spectres bruts et à droite les spectres après correction. En haut : signal brut de réflexion spéculaire et le résultat en unités « K » par application du calcul de Kramers-Kronig (transformation de la réflectance) ; au milieu, spectre obtenu en lumière diffuse : comparaison du spectre brut et du spectre corrigé selon Kubelka-Munk ; en bas spectre obtenu par ATR, ce dernier nécessite une correction peu importante diminuant l'absorbance pour les grandes longueurs d'onde qui serait surévaluée ; b) comparaison de 2 spectres de l'acide benzoïque, l'un par transmission, l'autre par réflexion diffuse et correction K-M.

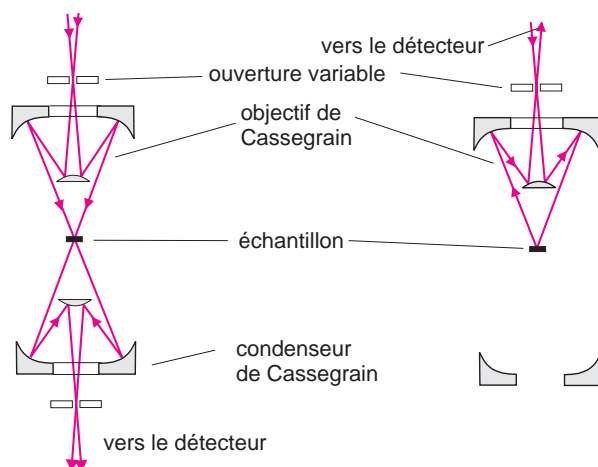


Figure 10.19 Trajet optique dans un microscope IR associé à un spectromètre (modèle IR-Plan de la société Nicolet).

L'échantillon peut être observé en transmission (dessin de gauche), ou en réflexion spéculaire (dessin de droite). Cet accessoire s'installe sur un spectromètre dont le faisceau est dévié. L'optique Cassegrain qui est appropriée pour l'examen des petits objets a aussi pour avantage dans l'IR que la lumière est réfléchiée à la surface de miroirs, sans avoir à traverser des lentilles optiques.

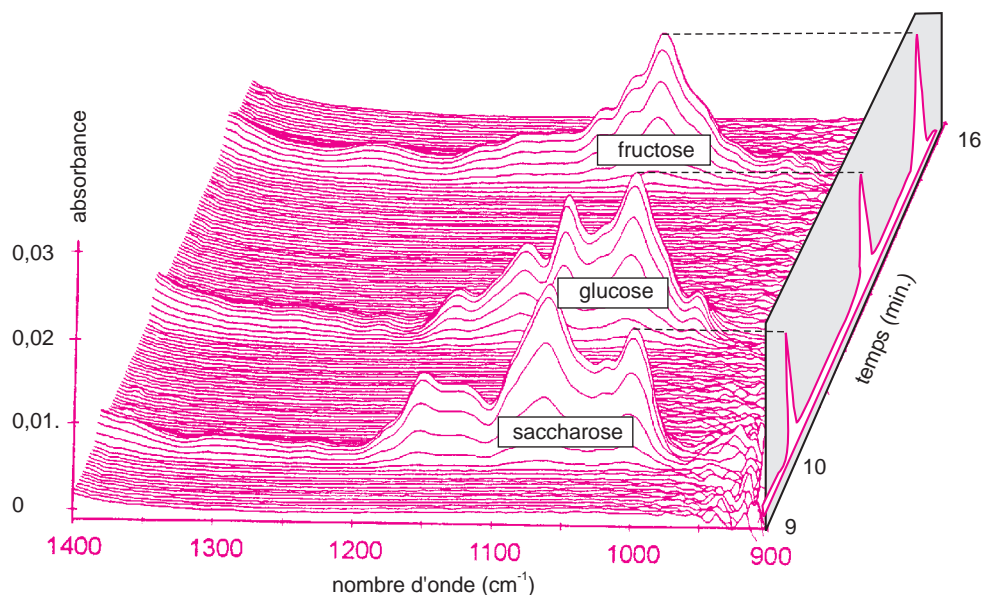


Figure 10.20 Tracé de Gram-Schmidt.

Reconstitution tridimensionnelle établie en différé, entre 1 400 et 900 cm^{-1} d'une solution contenant 10 mg/mL des 3 sucres saccharose, glucose et fructose, par CLHP/IRTF (volume injecté de 50 μL), d'après R. Keller et Coll., Anal. Chem. Vol. 69, p. 4288, 1997.

■ Dans les techniques couplées CPG/IRTF et CLHP/IRTF les chromatogrammes s'inscrivent en temps réel à l'écran. Ils sont issus d'un procédé de calcul rapide, l'algorithme de Gram-Schmidt, qui prend directement en compte les interférogrammes captés plusieurs fois par seconde pendant toute la durée de l'élution. Ceux-ci servent d'indicateur d'intensité du signal. Les spectres IR individuels sont obtenus en mode différé. Ils servent notamment à identifier les composés élués et à reconstituer des « pseudochromatogrammes » (fig. 10.20).

10.12 COMPARAISONS DE SPECTRES

L'identification des composés peut être facilitée à condition de disposer de *spectrothèques* générales ou spécialisées (polymères, solvants, adhésifs, molécules organiques classées par fonctions) que proposent plusieurs sociétés ou éditeurs (Aldrich, Sigma, Sadtler, Hummel...). Pour que les comparaisons soient fiables, les spectres archivés doivent avoir été obtenus à partir de composés dans le même état physique que le composé à identifier (en phase gazeuse par exemple, lorsqu'il s'agit de la méthode CPG/IRTF). Généralement les spectres en bibliothèque sont normalisés en attribuant à la bande la plus intense une absorbance égale à l'unité.

Le spectre à comparer est d'abord mis en conformité (absorbance et longueurs d'onde) avec le modèle des spectres en bibliothèque. La recherche consiste en une comparaison mathématique du spectre du composé inconnu avec tous ceux qui forment la spectrothèque considérée, pour établir à l'issue de la session de recherche un classement des spectres les plus voisins assorti d'un indice de fiabilité pour chacun d'eux. L'analyste doit examiner avec attention ces résultats qui ont pour objectif de l'aider et non de se substituer à lui, car si on change l'algorithme de comparaison, le classement final est différent. Les meilleures méthodes d'identification passent plutôt par les programmes interactifs dans lesquels l'analyste est mis à contribution afin de définir des *filtres* pour resserrer le champ d'investigation.

■ L'algorithme de la différence absolue est le plus simple : pour chacun des j spectres de la spectrothèque, on fait la somme S_j , pour les n points d'abscisses définis, des différences absolues entre l'absorbance de l'inconnu et celle du spectre j de la spectrothèque (formule 10.10). On classe ensuite les j sommes S_j par ordre croissant. Le résultat est présenté assorti d'un indice de corrélation.

$$S_j = \sum_{i=1}^n \left| y_i^{\text{réf}(j)} - y_i^{\text{inc.}} \right| \quad (10.10)$$

On peut choisir d'autres formules : remplacer les différences ci-dessus par leurs carrés ou par les différences de ces carrés ou encore faire la différence sur les incréments entre les deux points consécutifs. Chaque algorithme minimise ou met en valeur certains facteurs (différences d'intensité, bruit de fond, différence de pente...).

10.13 ANALYSE QUANTITATIVE

La précision des mesures d'absorbance et les possibilités de retraitement des spectres ont favorisé l'analyse quantitative par infrarouge. La méthode est devenue très utilisée à la fois parce qu'il est facile dans le moyen IR de repérer dans un spectre de mélange des bandes spécifiques au composé à doser et parce qu'on dispose de méthodes de traitement statistiques efficaces pour le proche IR.

■ Certains analystes considèrent encore que les appareils dispersifs à double faisceau sont préférables aux appareils IRTF pour l'analyse quantitative parce qu'ils sont les seuls à comparer les intensités transmises sur les deux voies (de référence et échantillon) au même instant.

10.13.1 Analyse quantitative dans le moyen infrarouge

Pour les échantillons solides dispersés au sein d'un disque de KBr dont l'épaisseur n'est pas mesurable avec précision, on ajoute un composé à usage de référence interne (carbonate de calcium, naphthalène, nitrure de sodium), en égale quantité à tous les standards ainsi qu'à l'échantillon.

Pour les liquides, les mesures d'absorbance se font dans des cuves à parcours optique ℓ faible, pour minimiser l'absorbance propre au solvant, dont aucun n'est vraiment transparent dans ce domaine. L'incertitude sur la valeur de ℓ est liée à la fragilité des matériaux utilisés pour faire les fenêtres des cellules et à leur construction. Cela impose d'étalonner périodiquement leur trajet optique.

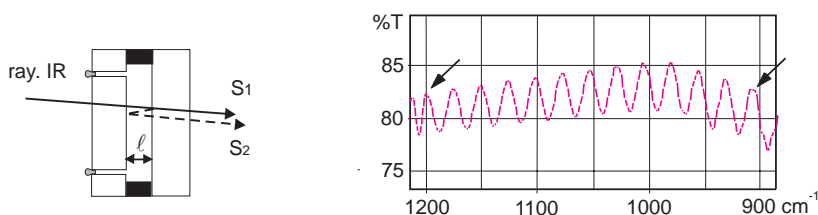


Figure 10.21 Calcul de l'épaisseur d'une cellule par la méthode des franges d'interférences.

À gauche, réflexions sur les parois d'une cuve (pour plus de clarté, l'angle d'incidence du faisceau sur la cellule est décalé de l'incidence normale d'un petit angle; à droite, partie d'un enregistrement obtenu à partir d'une cellule vide. On dénombre 12 franges entre les deux flèches. Le calcul (expression 10.11) conduit ici à $\ell = 204 \mu\text{m}$.

■ La mesure exacte du trajet optique dans les cellules de faible épaisseur se fait par une méthode interférométrique. On enregistre la transmittance de la cellule vide entre deux nombres d'onde $\bar{\nu}_1$ et $\bar{\nu}_2$. On voit, figure 10.21, que le rayon S_2 a subi une double réflexion sur les parois internes de la cellule, si bien que pour une incidence normale, on aura, si $2\ell = k\lambda$, addition des deux intensités lumineuses (les deux rayons S_1 direct et S_2 sont alors en phase). En fonction de la longueur d'onde, il se produit une modulation du faisceau principal S_1 de quelques pourcents. Après calculs, si N est le nombre de franges comptées entre $\bar{\nu}_1$ et $\bar{\nu}_2$ (en cm^{-1}), on aboutit à :

$$\ell_{(\text{cm})} = \frac{N}{2(\bar{\nu}_1 - \bar{\nu}_2)} \quad (10.11)$$

Il faut également tenir compte du fond d'absorption qui se manifeste assez souvent sur une bonne partie du spectre. Il dépend en particulier de la manière dont a été préparé l'échantillon. Les absorbances étant additives, il faut donc soustraire de l'absorbance totale celle qui n'est pas due au composé à doser. On évalue celle-ci par la méthode de la tangente (fig. 10.22).

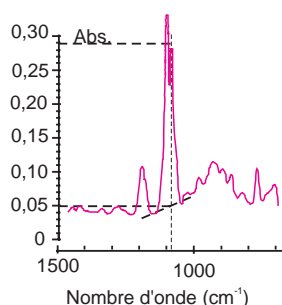


Figure 10.22 Correction du fond d'absorption.

En supposant, que dans l'exemple reproduit ci-contre, la mesure de concentration est basée sur l'absorbance de la bande à 970 cm^{-1} , il faut retrancher à l'absorbance totale (0,29), le fond d'absorption de 0,05, ce qui conduit à 0,24 u-abs.

10.13.2 Analyse quantitative dans le proche infrarouge

Dans le proche infrarouge, les bandes d'absorption ont pour origine les harmoniques ou des combinaisons des vibrations fondamentales du moyen infrarouge.

La molécule d'eau a de ce point de vue été particulièrement bien étudiée. En première approximation la bande qui apparaît vers $5\,154\text{ cm}^{-1}$ ($1\,940\text{ nm}$, voir figure 10.23) résulte de la combinaison entre la vibration asymétrique située à $3\,500\text{ cm}^{-1}$ et la vibration de déformation (cisaillement, voir §10.6) à $1\,645\text{ cm}^{-1}$ (fig. 10.16). Ces calculs simples ($3\,500 + 1\,645 = 5\,145$) ne sont qu'une approche imparfaite qui occulte un certain nombre de facteurs dont l'état physique des composés auquel l'infrarouge est sensible. Des approximations semblables peuvent être faites pour les bandes de combinaison des liaisons C–H, N–H, C–O... dans le proche infrarouge.

Dans ce domaine, essentiellement réservé aux analyses de contrôle, et où les spectres bruts sont assez souvent d'aspect déroutant par leur absence de bandes d'absorbance nettes, on ne peut que très rarement utiliser une méthode d'étalonnage basée sur l'absorbance à une seule longueur d'onde comme en spectrométrie UV–VIS (cf. chapitre 9). Pour beaucoup d'échantillons, comme les matrices complexes d'origine agroalimentaire, il est nécessaire, pour étalonner et pour valider, de disposer de nombreuses références représentatives, elles-mêmes mesurées par une méthode ayant fait ses preuves (Kjeldhal, par exemple, pour l'azote des protéines). Ainsi n'est-il pas rare d'établir des corrélations avec 50 échantillons de référence très semblables à ceux qu'on se propose de doser. De nombreux produits (protéines, huiles dans les graines, viandes), peuvent être analysés par cette méthode, en routine et sans préparation. D'une manière générale on recherche une relation entre certaines absorptions et la présence du ou des constituants à doser dans la matière à analyser. C'est le domaine de l'*analyse corrélative*.

Les bandes d'absorption sont peu intenses. Pour cette raison, les mesures sont effectuées dans des cuves de 1 cm de parcours optique, et sur le composé sans dilution. On opère en transmission ou en réflexion (par exemple on dose les protéines, les matières grasses, la cellulose ou l'amidon par réflectance).

Le passage par les courbes dérivées améliore la précision (fig. 10.23).

Certains logiciels font appel à des méthodes connues sous le nom de MLR (*Multiple Linear Regression*) ce qui permet de traiter statistiquement un grand nombre de points de mesure pour établir une équation d'étalonnage. Ces méthodes chimiométriques modélisent

l'ensemble de toutes les absorptions mesurées aux différentes longueurs d'onde, qu'elle qu'en soit l'origine : constituant à doser, matrice ou artefacts de l'appareil, sont couramment utilisées (méthode PCA (*Partial Component Analysis*) et méthode PLS (*Partial Least Squares*)).

En résumé, bien que certains dosages dans le proche infrarouge ne soient pas toujours très sensibles, ils sont réputés pour être maintenant très fiables.

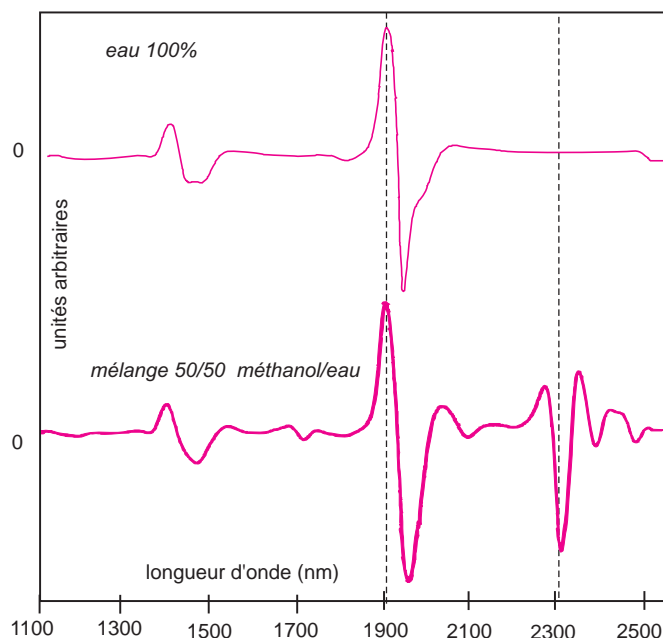


Figure 10.23 Courbes dérivées.

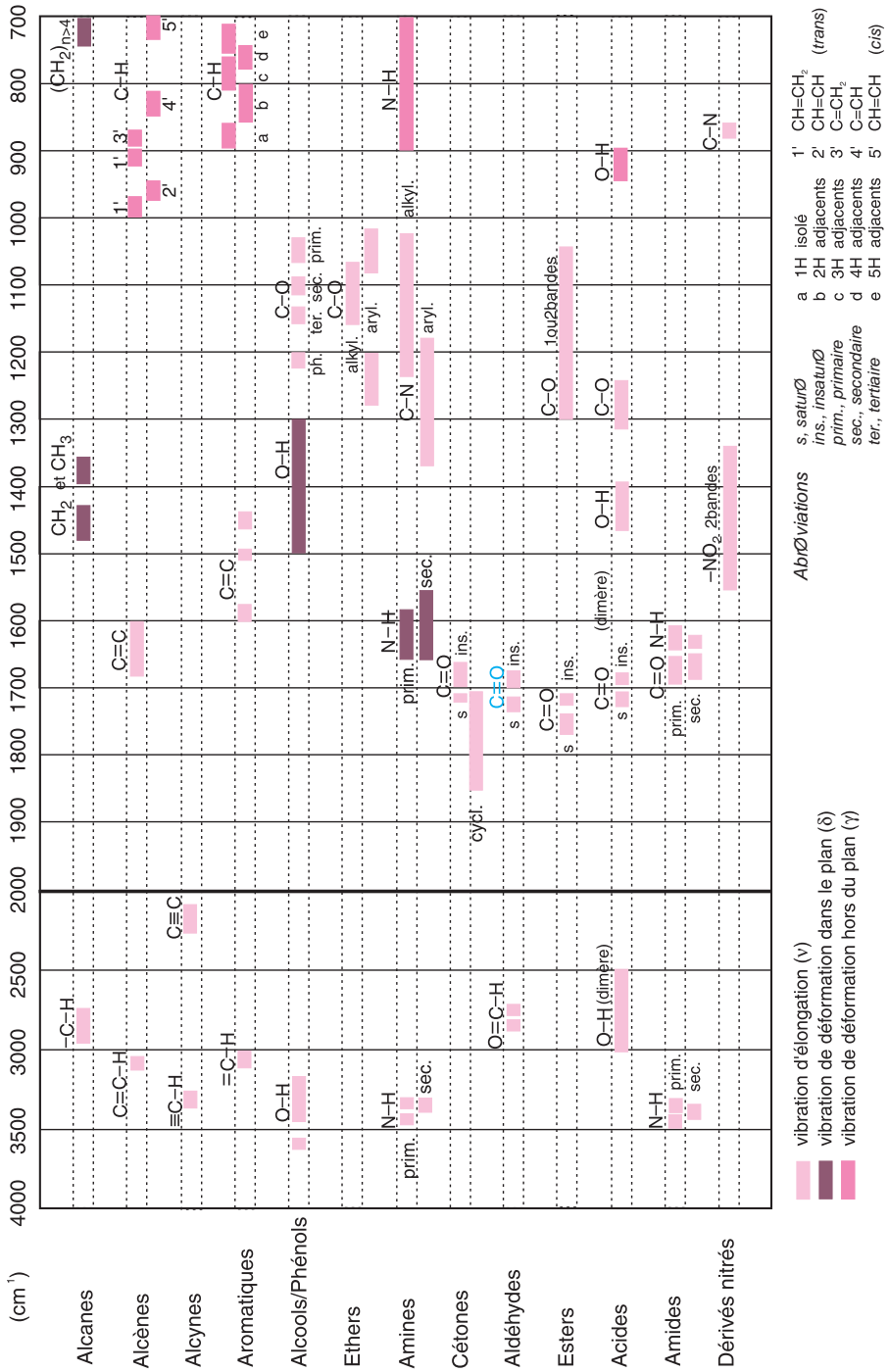
Comparaison des spectres de dérivée seconde dans le proche infrarouge de l'eau pure et d'un mélange moitié eau/moitié méthanol. On remarque qu'il est possible de doser le méthanol à partir du pic situé vers $2,3\ \mu\text{m}$, sans interférence avec le signal de l'eau situé vers $1,94\ \mu\text{m}$. Dans cette gamme spectrale, considérée comme l'extension de la plage du visible, les longueurs d'onde sont plutôt exprimées en nm ou μm .

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.bomem.com
foss-nirsystems.com
www.midac.com
www.perkin-elmer.com
www.varianinc.com

www.brukeroptics.com
www.mattsonir.com
www.nicolet.com
www.shimadzu.com
www.zeltex.com

Tableau 10.1 Corrélation dans le moyen infrarouge entre groupes fonctionnels et bandes d'absorption.



EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 10.1

- a) Quelle est l'énergie transportée par une radiation définie par un nombre d'onde de $1\,000\text{ cm}^{-1}$?
- b) Transformer $\lambda = 15\text{ }\mu\text{m}$ en cm^{-1} , puis en m^{-1} . À quelle longueur d'onde correspond $1\,700\text{ cm}^{-1}$?

Exercice 10.2

Sachant que la position de la bande d'absorption de la liaison C-H du chloroforme (trichlorométhane) est à $3\,018,5\text{ cm}^{-1}$, prévoir la position de la bande d'absorption de la liaison C-D du deutérochloroforme ($\bar{\nu}_{\text{exp.}} : 2\,253\text{ cm}^{-1}$).

Exercice 10.3

La liaison entre deux atomes d'une molécule biatomique est caractérisée par une constante de force de $1\,000\text{ N/m}$. Cette liaison est responsable d'une absorption située à $2\,000\text{ cm}^{-1}$. En admettant que l'énergie de la radiation incidente est transformée en énergie de vibration, trouver une valeur approchée de l'augmentation de l'élongation maximum de cette liaison.

Exercice 10.4

Sachant que la fréquence fondamentale du monoxyde de carbone est de $2\,135\text{ cm}^{-1}$ dans le tétrachlorure de carbone comme solvant, en déduire la « constante » de force de la liaison de cette molécule dans ces conditions.

Exercice 10.5

Un cristal de ZnSe ($n = 2,4$) de section parallélépipédique, utilisé dans un accessoire ATR horizontal, a pour dimensions $L \times l \times d = 24 \times 8 \times 3\text{ mm}$. L'angle d'incidence est de 45° . On dépose un composé d'indice 1,4 sur toute la face supérieure du cristal.

- a) Calculer l'angle critique de ce cristal lorsqu'il est recouvert du composé.
- b) Calculer le nombre de réflexions sur la face supérieure.
- c) En déduire l'épaisseur totale équivalente à $4\,000$ et à 400 cm^{-1} en admettant que pour chaque réflexion atténuée la lumière pénètre d'une distance égale à une longueur d'onde.
- d) Quelle correction est-il utile d'effectuer pour rendre le spectre équivalent à un spectre par transmission ?

Exercice 10.6

Parmi les films d'emballage commerciaux on trouve des copolymères éthylène/acétate de vinyle (EAV). Pour définir ces matériaux on calcule le % d'acétate de vinyle (AV). On se base sur l'intensité de la bande située à $1\,030\text{ cm}^{-1}$. L'absorbance est déterminée par la méthode des tangentes. Les résultats concernant 4 films EAV de composition connue et d'un film EVA inconnu, dont les épaisseurs (en μm) sont désignées par d , sont rassemblés ci-après.

EVA	%AV	$A_{1\,030}$	A_{720}	$d\ (\mu\text{m})$
1	0	0,01	1,18	56
2	2	0,16	1,55	80
3	7,5	0,61	1,49	82
4	15	0,36	0,45	27
inc.	?	0,7	1,54	90

- a) À quoi est due la bande située à $1\,030\text{ cm}^{-1}$?
- b) En tenant compte de l'épaisseur d du film, trouver par ajustement linéaire, à partir des résultats ci-dessus, l'équation de la droite $A_{1\,030} = f(\% \text{ AV})$, pour un film de $1\ \mu\text{m}$ d'épaisseur.
- c) Expliquer pourquoi la bande à 720 cm^{-1} du polyéthylène (due aux CH_2) peut être choisie comme étalon interne, puis calculer le rapport $A_{1\,030}/A_{720}$ pour les 4 films connus.
- d) En utilisant les 2 méthodes décrites en b) et c) calculer la teneur en AV exprimée en % de l'échantillon de film EVA inconnu.

Exercice 10.7

Dosage des hydrocarbures totaux dans les eaux par spectrophotométrie IR (Norme AFNOR T90 – 114).

Principe : extraction des composés hydrocarbonés par le tétrachlorure de carbone en milieu acide ; séparation des hydrocarbures des autres matières organiques par chromatographie ; détermination spectrophotométrique de la somme des absorbances aux quatre longueurs d'onde dans l'IR : 3 290 nm, 3 380 nm, 3 420 nm et 3 510 nm.

- a) Calculer, en cm^{-1} , les nombres d'onde correspondant à ces longueurs d'onde.
- b) À quelles vibrations correspondent ces nombres d'onde ?
- c) Pourquoi utilise-t-on le tétrachlorure de carbone comme solvant ?

Préparation de la gamme étalon.

Préparation de la solution mère : n -hexadécane ($m = 0,375\text{ g}$), iso-octane ($m = 0,375\text{ g}$), toluène ($m = 0,250\text{ g}$) dans une fiole d'un litre avec CCl_4 comme solvant.

Par dilution de la solution mère, on prépare une gamme de solutions étalons de concentrations en hydrocarbures totaux égales à 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.

Pour chaque solution, on mesure les absorbances aux quatre longueurs d'onde d'étude et on en fait la somme. On obtient les résultats suivants :

$C\ (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0	1	2	5	10	20	50
$A\ (\text{tot.})$	1	0,0217	0,0445	0,1105	0,2210	0,4420	1,1068

Déterminer l'équation de la droite de régression linéaire $A(\text{tot}) = f(C)$. Donner le coefficient de régression r .

Préparation de l'échantillon.

L'échantillon est prélevé dans un flacon en verre, acidifié à un pH voisin de 2 puis conservé à 4 °C environ jusqu'à analyse. Dans une ampoule à décanter, on verse 250 mL de l'échantillon auxquels on ajoute 25 mL de CCl_4 . On agite 15 min puis on laisse décanter. On filtre la phase organique sur sulfate de sodium anhydre puis on la passe sur une colonne de purification en silicate de magnésium. On récupère le filtrat et on ajuste à 25 mL avec le solvant. On enregistre le spectre IR entre 3 200 et 2 600 cm^{-1} et on fait la somme des absorbances aux quatre nombres d'onde d'étude. On trouve $A(\text{tot}) = 0,0047$ pour une eau de rivière.

Calculer la concentration massique en hydrocarbures totaux de l'échantillon étudié.

Chapitre 11

Fluorimétrie et chimiluminescence

*Certains composés organiques ou minéraux, liquides ou solides (cristaux moléculaires ou ioniques), qu'ils soient purs ou en solution, émettent de la lumière lorsqu'ils sont excités par des photons du domaine du visible ou du proche ultraviolet. Parmi les applications en analyse de ce phénomène, baptisé photoluminescence, se trouve la **fluorimétrie**, une méthode à la fois sélective et très sensible permettant de très nombreux dosages. L'intensité de fluorescence étant en rapport avec la concentration de l'analyte, les dosages sont faits à l'aide de fluorimètres ou de spectrofluorimètres. L'extinction extrêmement rapide de l'intensité lumineuse lorsque l'excitation cesse, fait également l'objet de mesures à des fins analytiques. Par opposition, la **phosphorescence** se caractérise par une décroissance dans le temps beaucoup plus lente. La fluorescence est également mise à profit dans la conception de détecteurs utilisés en chromatographie liquide. Bien que l'origine en soit différente, la **chimiluminescence**, qui consiste en émission de lumière au cours de certaines réactions chimiques, a reçu quelques applications en chimie analytique.*

11.1 FLUORESCENCE ET PHOSPHORESCENCE

Beaucoup de composés, lorsqu'ils sont excités par une source lumineuse du domaine du visible ou du proche ultraviolet, absorbent de l'énergie pour la restituer par la suite sous forme d'un rayonnement. Certains présentent la faculté plus ou moins prononcée de réémettre quasi-instantanément à une longueur d'onde plus grande que celle de la lumière d'origine. Ils sont dits *fluorescents* (fig. 11.1 et 11.2). Lorsqu'on éteint la source, l'intensité lumineuse diminue extrêmement rapidement en suivant une loi exponentielle.

L'expression 11.1 relie l'intensité de fluorescence $I_{f(t)}$ et le temps écoulé t après l'excitation :

$$I_{f(t)} = I_{f(0)} \cdot \exp [-kt] \quad (11.1)$$

Cette loi de décroissance s'applique aussi à la *phosphorescence*. La différence tient à la valeur de la constante k qui est beaucoup plus grande pour la *fluorescence* que pour la *phosphorescence* car celle-ci décroît beaucoup plus lentement. La *durée de vie* de fluorescence τ_0 est définie à partir de k par $\tau_0 = 1/k$. À l'instant τ_0 , l'intensité $I_{f(t)}$ vaut, d'après 11.1, 36,8 % de l'intensité de départ $I_{f(0)}$. Autrement dit, un composé fluorescent corres-

pond à l'échelle microscopique à une population d'espèces individuelles dont 63,2 % sont revenues à un état non émissif après ce temps. τ_0 est de l'ordre de quelques nanosecondes. Pour faciliter les mesures de fluorescence, les instruments courants opèrent en régime stationnaire, c'est-à-dire en maintenant la source d'excitation allumée, avec, en contre-partie l'obligation évidente de différencier la lumière de la source et celle de fluorescence.

La figure 11.1 illustre par un exemple l'apparente symétrie en miroir des spectres d'absorbance et de fluorescence de nombreux composés. Pour obtenir cette représentation on réunit sur le même graphe avec une double échelle, le spectre en absorbance et celui en émittance.

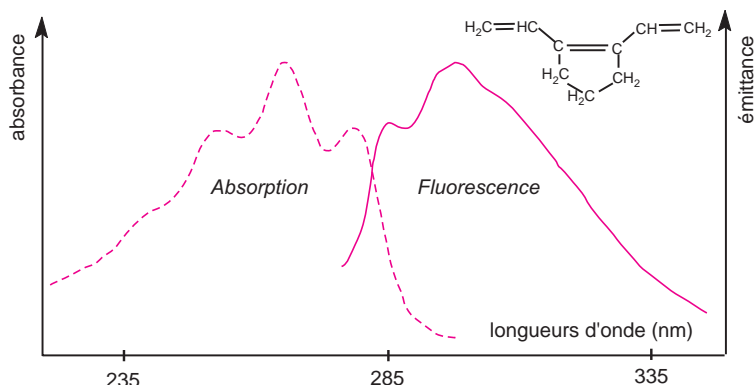


Figure 11.1 Représentation sur un même graphe des spectres d'absorption et de fluorescence d'un composé éthylénique.

Le spectre de fluorescence qui ressemble à l'image dans un miroir du spectre d'absorption, ainsi que le « Stokes shift » peuvent s'interpréter en considérant les diagrammes énergétiques (fig. 11.2). Exemple extrait de H. Jacobs et Coll, *Tetrahedron* 1993, p. 6 045.

■ **Fluorescence résolue dans le temps.** L'avènement de sources lumineuses à impulsions ultra-brèves (lasers picoseconde et diodes laser) permet d'accéder aux courbes de décroissance de la fluorescence en fonction du temps. De nouvelles applications basées sur la connaissance des durées de vie en découlent, mais elles sont encore peu nombreuses en analyse chimique.

11.2 ORIGINE DE LA FLUORESCENCE

Soumise à l'excitation lumineuse, la molécule du composé (le soluté, dans l'état électronique fondamental S_0), est portée dans son premier état électronique excité S_1 . Ses électrons et ceux des molécules environnantes de solvant se rééquilibrent quasiment instantanément ; mais les positions des noyaux des atomes en revanche restent identiques à ce qu'elles sont dans l'état fondamental (c'est le principe de Franck-Condon). Le système soluté/cage de solvant étant ainsi hors-équilibre, il va évoluer vers une conformation plus stable de l'état électronique excité S_1 (fig. 11.2). Très rapidement, (10^{-12} s), par des processus dits de *conversion interne*, les molécules rejoignent, sans émettre de photons, l'état V_0 du niveau S_1 . Si ce niveau est compatible avec le niveau fondamental le système peut y redescendre par une étape de fluorescence (10^{-11} à 10^{-8} s) au cours de laquelle les molécules retournent

dans un des états vibrationnels de l'état S_0 initial en émettant des photons. Au cours de la fluorescence qui accompagne le retour à l'état initial, la molécule peut conserver une partie de l'énergie reçue sous forme d'énergie vibrationnelle. Cet excès d'énergie de vibration est dissipé par collisions ou autres processus non radiatifs baptisés mécanismes de *relaxation vibrationnelle*. Il peut se produire également une émission de photons beaucoup moins énergétiques, à l'origine d'une fluorescence située dans le moyen infrarouge.

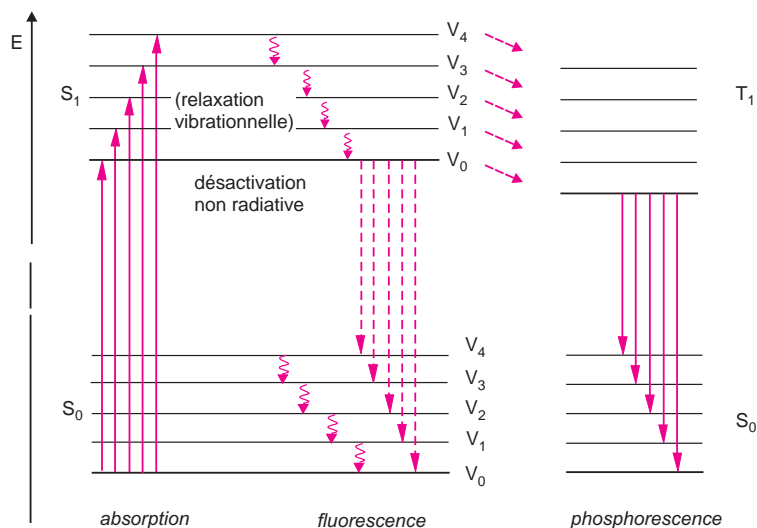


Figure 11.2 Diagramme énergétique comparatif de la fluorescence et de la phosphorescence.

Les flèches courtes correspondent à des mécanismes de conversion interne sans émission de photons. La fluorescence résulte de transferts entre états de même multiplicité (même état de spin), et la phosphorescence entre états de multiplicités différentes. L'état T_1 produit un retard dans le retour à l'état fondamental pouvant atteindre plusieurs heures. Le « stokes shift » correspond à l'énergie dissipée sous forme de chaleur (relaxation vibrationnelle) pendant la durée de vie de l'état excité, donc avant que les photons soient émis. La situation réelle est plus complexe que ce diagramme un peu trop simplifié, dit de Jablonski, peut le laisser supposer. À notre échelle, un composé peut être à la fois fluorescent et phosphorescent car à l'échelle moléculaire les espèces individuelles qui le composent n'ont pas le même comportement.

La *phosphorescence* correspond à un mode de désexcitation plus complexe. Après la phase d'absorption correspondant au transfert d'un électron dans un niveau S_1 (état singulet), on assiste, si la relaxation vibrationnelle est assez lente, au retournement de spin de l'électron pour conduire à un état T_1 un peu plus stable (état triplet). De ce fait, le retour ultérieur au niveau fondamental est ralenti puisqu'il implique un nouveau retournement du spin de cet électron. Les durées de vies peuvent dépasser plusieurs minutes (fig. 11.2).

La sensibilité en fluorimétrie est souvent 1 000 fois supérieure à celle que l'on connaît en absorption UV/visible. Cependant l'usage correct de ces techniques exige une bonne connaissance du phénomène afin d'éviter de nombreuses sources d'erreurs.

■ La fluorescence est souvent le privilège des molécules cycliques, rigides et possédant des liaisons π . Elle est augmentée par la présence de groupes électro-donneurs et diminuée avec les groupes électro-attracteurs (fig. 11.3). Elle dépend également du pH et du solvant. Les molécules non rigides par contre, perdent facilement la totalité de l'énergie absorbée par

dégradation et relaxation vibrationnelle. Par analogie, on peut comparer ce phénomène à l'effet que produit un coup de marteau soit sur un bloc mou, caoutchouc par exemple, soit sur quelque chose de dur, comme une enclume. Sur le caoutchouc, l'énergie se disperse dans la masse (échauffement) et aucun bruit n'est émis, en revanche, sur l'enclume, une partie de l'énergie mécanique est retransmise vers l'extérieur (rayonnement sonore), phénomène comparable à la fluorescence.

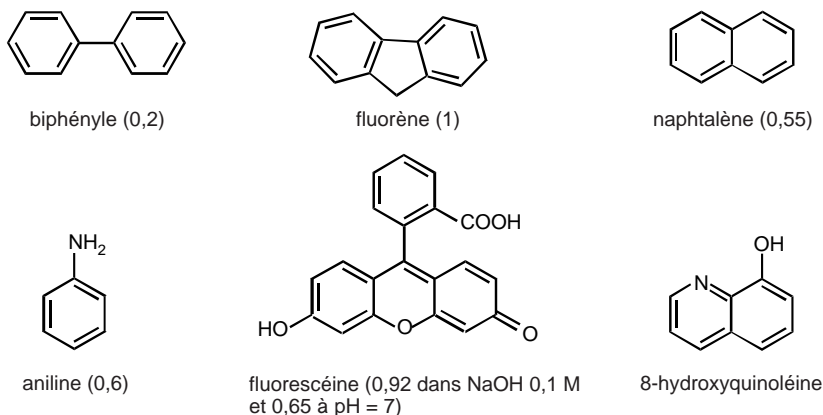


Figure 11.3 Composés fluorescents aromatiques.

Le nom est suivi du rendement de fluorescence Φ_f (voir § 11.3) dont la valeur est obtenue de proche en proche par comparaison avec des composés de fluorescence connue. Les mesures sont faites à 77 K. La 8-hydroxyquinoléine est représentative de diverses molécules formant des complexes de chélation fluorescents avec certains ions métalliques.

11.3 RELATION ENTRE FLUORESCENCE ET CONCENTRATION

En chaque point de la solution l'intensité de fluorescence est différente parce qu'une partie de l'intensité de la radiation excitatrice est absorbée avant d'atteindre le point considéré et parce qu'une partie de la lumière de fluorescence se trouve piégée avant de sortir de la cellule. Globalement la fluorescence reçue par le capteur du détecteur correspond donc à la résultante des fluorescences de chacun des petits volumes individuels constituant l'espace délimité par les fenêtres d'entrée et de sortie (fig. 11.4). C'est pourquoi le calcul *a priori* de l'intensité de fluorescence (émittance I_f) de l'échantillon est difficile. Le phénomène d'affaiblissement lumineux appelé « filtre interne », dû au recouvrement partiel des spectres d'absorption et d'émission (*quenching couleur*) est augmenté des transferts d'énergie d'espèces excitées avec d'autres molécules ou ions étrangers par collisions ou formation de complexes (*quenching chimique*). Ainsi l'oxygène entraîne une sous-estimation de la fluorescence.

Pour les solutions, on définit le rendement quantique de fluorescence Φ_f (compris entre 0 et 1) par le rapport du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés, ce dernier étant équivalent au rapport de l'intensité de fluorescence I_f sur l'intensité absorbée I_a (relation 11.2).

$$\Phi_f = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} = \frac{I_f}{I_a} \quad (11.2)$$

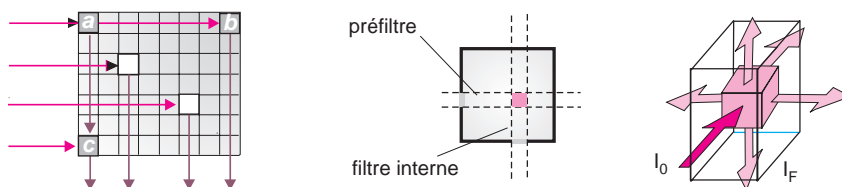


Figure 11.4 Intensité de fluorescence.

Suivant l'endroit de la solution où la fluorescence est émise, une intensité lumineuse variable atteint le détecteur ; il est possible d'évaluer la réabsorption de la lumière de fluorescence (comparaison entre a et c) et l'absorption de la lumière incidente (comparaison entre a et b). La présence d'un iris fait que seule la lumière en provenance de la partie centrale de la cuve, est recueillie.

En posant que $I_a = I_0 - I_t$ (I_t désignant l'intensité de la lumière transmise), la relation 11.2 permet de relier I_f à la concentration c du composé :

$$I_f = \Phi_f(I_0 - I_t) \quad \text{soit} \quad I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot \left(1 - \frac{I_t}{I_0}\right) \quad (11.3)$$

Sachant que l'absorbance A est égale à $\log I_0/I$, l'expression 11.3 devient :

$$I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-A}) \quad (11.4)$$

Or

$$10^{-A} = 1 - 2,303A + \frac{(2,303A)^2}{2!} - \dots + \dots$$

Si la solution est diluée, le terme A est très petit et le terme 10^{-A} est donc proche de $1 - 2,3A$. L'expression (11.4) peut être simplifiée et devient :

$$I_f = 2,3 \cdot \Phi_f \cdot I_0 \cdot A \quad \text{soit} \quad I_f = 2,3 \cdot \Phi_f \cdot I_0 \cdot \varepsilon \cdot \ell \cdot c \quad (11.5)$$

avec I_0 l'intensité de la radiation excitatrice, c concentration molaire de la substance, ε son coefficient d'absorption molaire, ℓ épaisseur de la cuve, et Φ_f rendement de fluorescence.

Cette dernière expression fait apparaître que l'intensité de fluorescence dépend de la concentration (c), des conditions expérimentales (ℓ , I_0) et du composé (ε , Φ_f). Dans la pratique d'un dosage, les paramètres propres au composé étudié et à l'appareil sont fixes. En les réunissant dans un même facteur K , on écrira pour les très faibles concentrations ($A < 0,01$)

$$I_f = K \cdot I_0 \cdot c \quad (11.6)$$

■ Les dosages par fluorimétrie font appel aux nombreuses méthodes classiques d'étalonnage avec une seule ou plusieurs solutions de référence, ou encore aux méthodes d'ajout, mais pour obtenir de bons résultats, les solutions doivent être très diluées.

Au-delà d'une certaine limite, la fluorescence n'est plus proportionnelle à la concentration par suite de la non linéarité de la loi de Beer. L'excitation est proportionnellement plus faible et il apparaît des complexes d'association entre molécules excitées et molécules restées à l'état fondamental. On aboutit au résultat, qui semble paradoxal, selon lequel la fluorescence peut aller jusqu'à diminuer. La courbe de la figure 11.5 est l'illustration graphique de l'expression 11.7 en donnant des valeurs raisonnables à ces différents paramètres.

$$I_f = \Phi \cdot k \cdot I_0 \cdot 10^{-(\varepsilon_1 \ell_1 + \varepsilon_2 \ell_2)c} \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \ell c}) \quad (11.7)$$

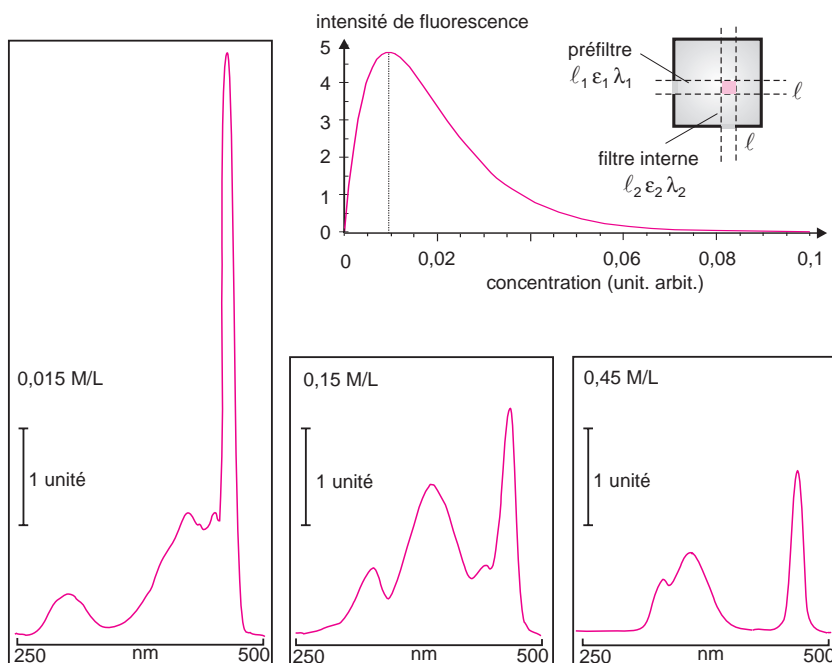


Figure 11.5 Intensité de fluorescence et concentration.

Modélisation à partir de la formule 11.7 de l'effet de la concentration sur l'intensité de fluorescence. On observe un maximum de fluorescence au-delà duquel elle diminue. Plus la solution est concentrée, plus faible est la fluorescence — sorte de *roll over* ou de *self quenching*. L'illustration correspond à 3 enregistrements à même échelle de solutions de biacétyle dans le tétrachlorométhane. La courbe correspond à la lumière recueillie en provenance du petit volume de côté ℓ situé au sein de la solution comme précisé sur la figure 11.4 (paramètres ℓ et ε choisis arbitrairement).

11.4 DIFFUSION RAYLEIGH ET DIFFUSION RAMAN

Si les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont voisines il peut y avoir risque de confusion entre la fluorescence de l'échantillon et deux émissions parasites dues au solvant :

11.4.1 Diffusion Rayleigh

La diffusion Rayleigh est la réémission, à la même longueur d'onde, d'une petite fraction de la lumière excitatrice dans toutes les directions par le solvant dans lequel se trouve le composé (fig. 11.6). Son intensité dépend de la polarisabilité des molécules de ce solvant.

11.4.2 Diffusion Raman

La diffusion Raman, de 100 à 1 000 fois plus faible que la diffusion Rayleigh, provient du transfert d'une partie de l'énergie de la lumière excitatrice aux molécules de solvant sous forme d'énergie de vibration. Les molécules de solvant réémettent donc des photons de

moindre énergie que ceux ayant servi à les exciter. Par rapport à la diffusion Rayleigh, le pic de diffusion Raman est déplacé vers les grandes longueurs d'onde. Pour chaque solvant la différence d'énergie entre les photons absorbés et les photons réémis est constante, si bien qu'en modifiant la longueur d'onde d'excitation, on déplace la position du pic Raman (tab. 11.1 et fig. 11.6).

Tableau 11.1 Positions des pics Raman, calculées pour quatre solvants usuels et cinq longueurs d'onde excitatrices d'une lampe à mercure

Excitation (nm)	254	313	365	405	436	écart (cm ⁻¹)
eau	278	350	416	469	511	3 380
éthanol	274	344	405	459	500	2 920
cyclohexane	274	344	408	458	499	2 880
chloroforme	275	346	410	461	502	3 020

■ La diffusion Raman de l'eau sert de test de sensibilité des fluorimètres. Celui-ci consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic Raman avec une cellule remplie d'eau, par exemple à 397 nm (25 191 cm⁻¹) si l'excitation est réglée à 350 nm (28 571 cm⁻¹), par suite du décalage de 3 380 cm⁻¹ propre à ce solvant.

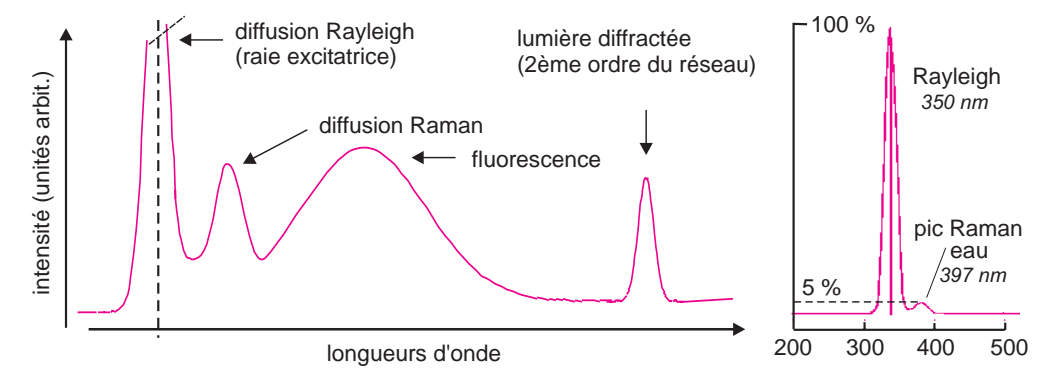


Figure 11.6 Les diverses composantes d'un spectre de fluorescence. La position de la raie Raman dépend de la longueur d'onde de la raie excitatrice et du solvant. À droite, test de sensibilité d'un fluorimètre.

■ La fluorescence n'est pas seulement mise à profit à des fins d'analyse. C'est ainsi qu'on ajoute aux poudres à laver le linge un additif fluorescent destiné à s'accrocher aux fibres textiles. Ce composé absorbe les radiations solaires invisibles pour l'œil et restitue l'énergie captée sous forme de radiations de plus grande longueur d'onde, dans la partie bleue du spectre visible.

11.5 INSTRUMENTATION

Le composé fluorescent qui fait l'objet du dosage se comporte comme une source qui irradie dans toutes les directions. Par construction, l'appareil recueille en général la lumière émise suivant un axe qui est perpendiculaire au faisceau de la lumière en provenance de la source excitatrice. Pour les solutions fortement absorbantes, l'observation peut se faire dans le prolongement du faisceau incident et pour les échantillons opaques ou semi-opaques dans une direction frontale sous un angle variable (fig. 11.7). La source excitatrice est souvent constituée par une lampe à arc xénon de 150 à 800 watts. La mesure de l'intensité lumineuse est faite par un photomultiplicateur ou une photodiode.

Le solvant, la température, le pH et la concentration sont autant de paramètres qui interviennent sur les intensités de fluorescence.

- Certains gaz à l'état de traces dans l'atmosphère terrestre sont quantifiés à partir de leur fluorescence rétrodiffusée, induite par excitation d'une très courte impulsion (1 μ s) d'un puissant laser monochromatique qu'il est possible d'accorder sur une longueur d'onde spécifique du composé recherché (dispositif appelé lidar).

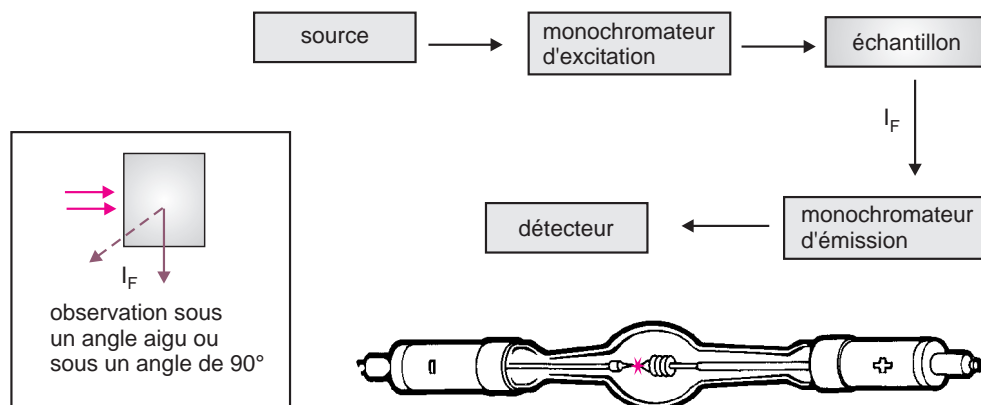


Figure 11.7 Agencement des différentes composantes d'un spectrofluorimètre et lampe à arc xénon.

La fluorescence est mesurée en régime permanent « steady state », en maintenant l'excitation, à la différence de l'étude de la fluorescence dynamique. Deux géométries, angle droit et angle aigu, sont utilisées pour l'examen de la lumière émise. Modèle de lampe à arc xénon. La pression de xénon dans la lampe est d'environ 1 MPa. Ces lampes à arc sans filament, à enveloppe en verre de silice, sont des sources de « lumière blanche ». La cathode correspond à l'électrode la plus fine (reproduit avec l'autorisation de la société Oriol).

Deux grandes catégories d'appareils sont proposées par les constructeurs :

- les fluorimètres à rapport de fluorescence,
- les spectrofluorimètres.

11.5.1 Fluorimètres à rapport de fluorescence (méthode ratiométrique)

La lumière émise par la source traverse d'abord le monochromateur d'excitation qui permet de sélectionner la bande étroite de longueurs d'onde (15 nm) qui va servir à exciter l'échantillon. Une partie de la fluorescence émise par le composé est captée dans une direction perpendiculaire ou parallèle (selon les modèles) au faisceau incident. Cette lumière traverse le monochromateur d'émission qui sélectionne la longueur d'onde de mesure avant d'atteindre le détecteur. De nombreux constructeurs commercialisent des modèles avec filtres (fig. 11.8). Ces appareils sont de type monofaisceau. Ils comportent un compartiment à tournelle dans laquelle sont placées à la fois les cuves contenant les solutions étalons, l'échantillon ainsi qu'une cuve remplie d'un composé à usage de standard fluorescent. En alternant sur le trajet optique les solutions étalons et échantillon et le standard fluorescent on mesure le rapport de fluorescence qui sert à la fois à construire la courbe d'étalonnage et, pour l'échantillon, de paramètre de mesure. On élimine ainsi les fluctuations possibles de la source et bon nombre de paramètres de réglage de l'appareil. Les standards courants utilisés dans cette méthode ratiométrique sont généralement des solutions de sulfate de quinine, de rhodamine B ou de 2-aminopyridine.

- L'emploi d'une lampe flash xénon comme source permet d'étudier la fluorescence après extinction de la source. Cette méthode est connue en immunologie où les complexes fluorescents obtenus avec les sels de lanthane ont une durée de vie de fluorescence d'environ 1 ms, suffisante pour être à l'origine de dosages très sensibles (de l'ordre de la picomole).

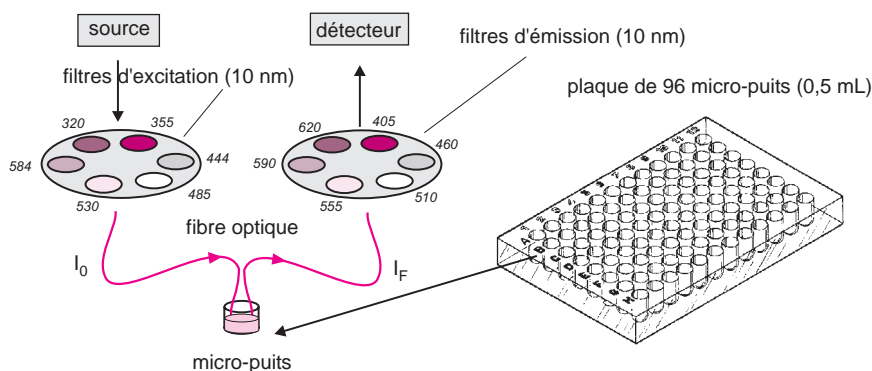


Figure 11.8 Schéma optique simplifié d'un fluorimètre à lecteur de micro-puits. Une fibre optique amène la lumière excitatrice au niveau du puits choisi et une seconde fibre récupère la fluorescence, ici sous une géométrie frontale. Pour le contrôle des résultats en chimie combinatoire et autres méthodes de screening en immunologie/enzymologie ces fluorimètres peuvent recevoir des micro-plaques comportant de 6 à 384 puits.

11.5.2 Spectrofluorimètres

Les spectrofluorimètres sont dotés de fonctions qui leur permettent l'étude plus complète des composés fluorescents, notamment par l'enregistrement de leurs spectres d'émission et d'excitation (fig. 11.9). Ils disposent de deux monochromateurs motorisés pouvant ba-

layer chacun une bande spectrale. On obtient le spectre d'émission en maintenant la longueur d'onde d'excitation fixe, et le spectre d'excitation en maintenant la longueur d'onde d'émission fixe.

Les spectrofluorimètres disposent de logiciels qui peuvent déterminer automatiquement le meilleur couple de longueurs d'onde excitation/émission (fig. 11.10).

Manuellement le processus peut se faire par la méthode dite « un seul facteur à la fois » :

- on enregistre le spectre UV du composé avec un spectrophotomètre UV/VIS ;
- on règle le monochromateur d'excitation à la valeur correspondant au maximum du spectre d'absorption ;
- on enregistre le spectre de fluorescence ;
- on règle le monochromateur d'émission à la longueur d'onde du maximum de fluorescence et on fait varier la longueur d'onde d'excitation. On obtient le spectre d'excitation qui permet un meilleur choix final de la radiation excitatrice (qui peut être distincte de celle correspondant au maximum d'absorption du spectre UV).

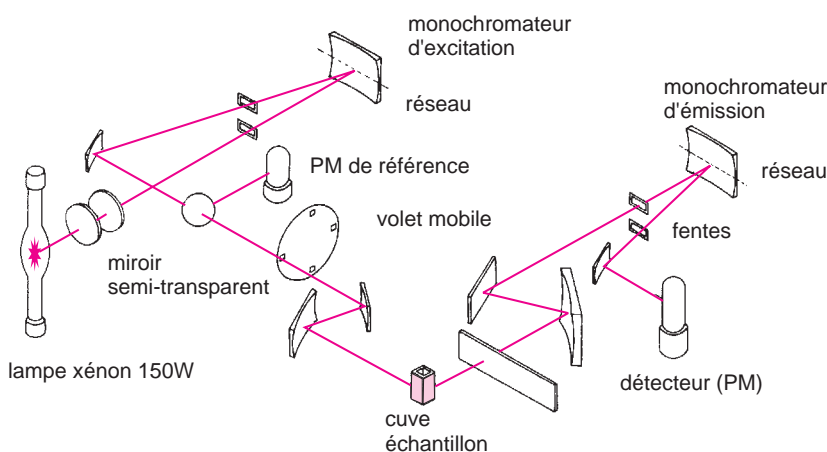


Figure 11.9 Schéma du spectrofluorimètre Shimadzu F-4500.

Une fraction du faisceau incident, réfléchi par un miroir semi-transparent, arrive sur une photodiode de référence. La comparaison des signaux des deux détecteurs permet d'éliminer la dérive de la source. Ce procédé à un seul faisceau permet d'obtenir la stabilité propre aux appareils à double faisceau. Les spectres présentent souvent des petites différences lorsqu'ils proviennent d'appareils différents (reproduit avec l'autorisation de la société Shimadzu).

■ Certains instruments permettent la mesure des durées de vie de fluorescence, bien que celles-ci soient très courtes. Il existe plusieurs méthodes basées soit sur l'enregistrement de la courbe de décroissance de la lumière émise lorsque l'excitation a cessé, soit sur la comparaison de la modulation de la fluorescence en fonction d'une modulation rapide de l'excitation. La première méthode impose d'utiliser une source pulsée (laser) et la seconde une source modulée de fréquence élevée. En analysant le signal obtenu (modulation et phase) en fonction de la fréquence de la source excitatrice, il est ainsi possible de calculer la durée de vie de fluorescence.

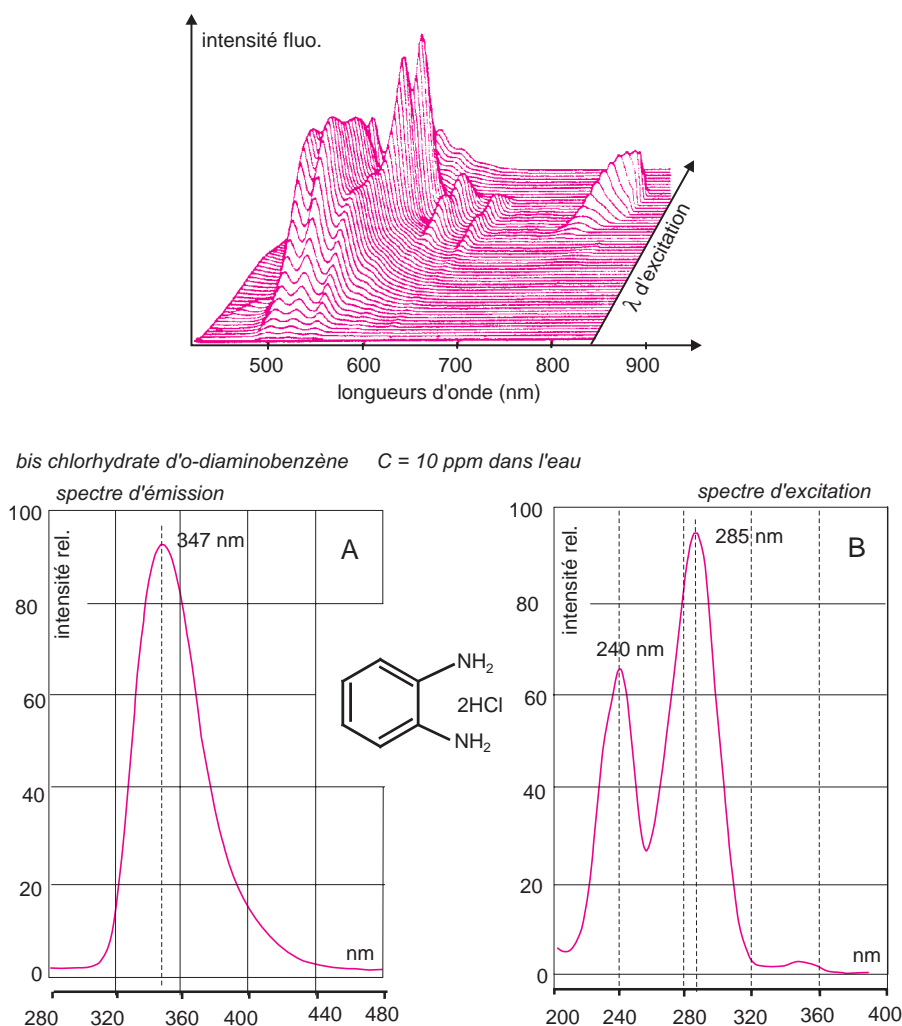


Figure 11.10 Spectres de fluorescence.

En haut : *Matrice d'émission-excitation d'un mélange de deux ions fluorescents*. Représentation topographique en 3D de la fluorescence totale d'un mélange de deux sels d'uranium et de terbium en faisant varier la longueur d'onde excitatrice. Un tel enregistrement permettrait de trouver les conditions optimales de dosage de ce mélange. En bas : *Spectres d'émission-excitation*. **A** : Spectre d'émission de fluorescence obtenu en maintenant la longueur d'onde d'excitation à 285 nm. **B** : Spectre d'excitation obtenu en maintenant le monochromateur d'émission à 347 nm pendant la durée de l'enregistrement.

11.6 QUELQUES APPLICATIONS DE LA FLUORESCENCE

En dehors des molécules possédant une fluorescence naturelle (moins de 10 % de l'ensemble des composés), beaucoup peuvent le devenir par le biais d'une modification ou d'une association avec une autre molécule fluorescente. On peut greffer par exemple sur l'analyte

un *réactif fluorophore* par réaction chimique (les 7-hydroxycoumarines peuvent être utilisées à cet effet). C'est la *dérivation de fluorescence*, qui rappelle le procédé employé en colorimétrie.

Pour doser les métaux sous forme de cations, on forme des complexes de chélation avec l'oxine (8-hydroxyquinoléine), l'alizarine ou la benzoïne, extractibles par les solvants organiques.

En biochimie la fluorescence trouve de nombreuses applications pour quantifier les protéines ou les acides nucléiques au moyen de réactifs qui se fixent spécifiquement sur ces composés. Cette approche, quelquefois très élaborée, en association avec l'électrophorèse, constitue une alternative plus sensible et moins contraignante que la révélation au moyen de substrats radioactifs.

■ La **chimifluorescence** (à ne pas confondre avec la chimiluminescence) est également un moyen particulièrement sensible de détection de protéines spécifiques. On doit disposer pour cela d'un anticorps spécifique porteur d'un conjugué enzymatique, tel une phosphatase (fig. 11.11). Mis en présence d'un substrat tel un dérivé phosphaté de la fluorescéine, il y a libération de cette dernière facile à mettre en évidence par sa fluorescence déclenchée par une source excitatrice.

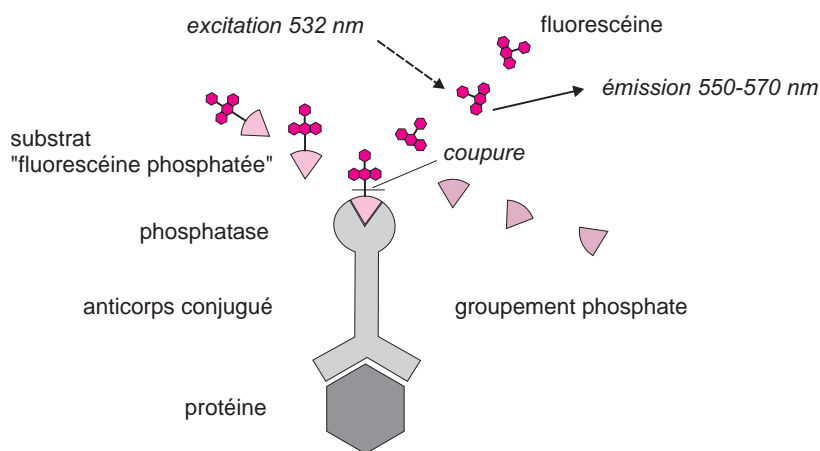


Figure 11.11 Processus d'un dosage de protéine par chimifluorescence en biochimie.

La figure regroupe simplement les réactions mises en jeu sachant que pour réaliser un tel dosage on suit un protocole dans lequel les différentes réactions se font au cours d'étapes distinctes.

En analyse par CLHP, on peut ainsi marquer les amines (avec d'autres coumarines), ce qui permet des seuils de détection extrêmement bas, de l'ordre de l'attomole (10^{-18} M). Parmi les applications classiques actuelles de la fluorescence, figurent les dosages des hydrocarbures polycycliques aromatiques (« HPA ») dans les eaux de consommation, par CLHP. Dans ce cas, le détecteur est muni d'une cellule de fluorescence à circulation, installée en aval de la colonne du chromatographe. Ce mode de détection est particulièrement bien adapté pour atteindre les seuils très bas imposés par la législation. Ce même procédé permet de doser également les aflatoxines (fig. 11.12), ainsi que de nombreux autres composés organiques (adrénaline, quinine, stéroïdes, vitamines).

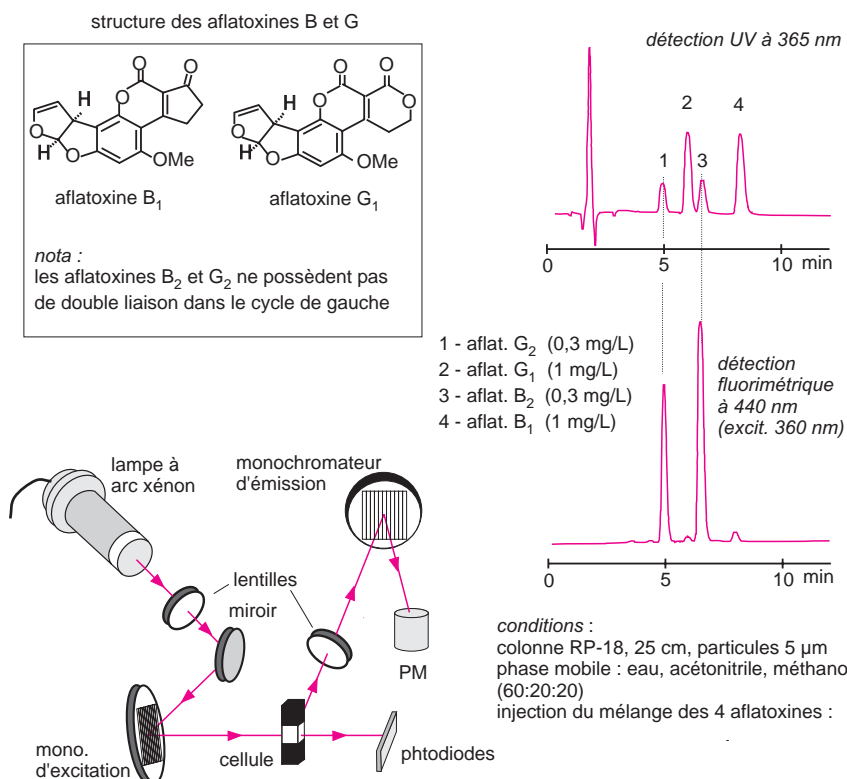


Figure 11.12 Comparaison d'une détection UV et par fluorescence après séparation chromatographique.

Les aflatoxines, contaminants cancérogènes présents dans certains lots de céréales, font l'objet de contrôles par CLHP. On remarquera que, par détection UV, les intensités des pics varient comme les concentrations des 4 composés, alors que la détection par fluorescence est beaucoup plus sensible pour les G₂ et B₂ (reproduit avec l'autorisation de la société SUPELCO). En bas à gauche, agencement des différentes parties d'un détecteur basé sur la fluorescence. Il permet de trouver pour chaque composé élué le meilleur couple excitation /émission en un temps très bref sans interrompre le déroulement de la chromatographie. Les chromatogrammes obtenus sont étudiés en différé (reproduit d'après un document de la société Agilent technologies).

11.7 FLUORIMÉTRIE RÉSOLUE DANS LE TEMPS

Les avancées technologiques permettent d'accéder désormais aux courbes de décroissance de fluorescence. Sachant que l'intensité lumineuse décroît très vite, on soumet le composé en solution très diluée à une source pulsée (diode laser par exemple) de quelques picosecondes, de manière répétitive à des fréquences de plusieurs mégahertz. Au cours des cycles successifs, quand la source est éteinte, le détecteur mesure le temps écoulé jusqu'à l'instant aléatoire où un photon de fluorescence l'atteint. Il incrémente alors le canal mémoire qui est réservé au temps correspondant. Après avoir accumulé un grand nombre de photons, le graphe de la décroissance est finalement reconstruit en faisant un histogramme du contenu de tous les canaux mémoire (fig. 11.13).

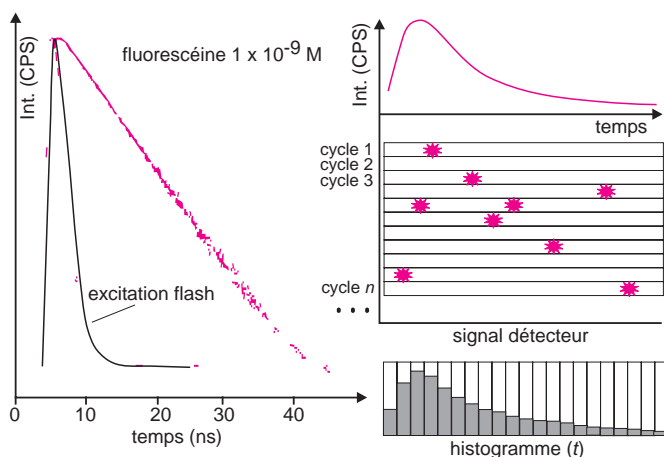


Figure 11.13 Représentation de la décroissance de fluorescence et principe de la mesure. Sur le graphe, chaque point figure le contenu d'un canal mémoire (couple temps /nombre de photons). La courbe de décroissance exponentielle attendue apparaît ici sous forme d'un tracé linéaire, ce qui est dû au choix de l'échelle logarithmique pour les ordonnées. L'illustration de droite indique comment on accède à cette représentation.

11.8 CHIMILUMINESCENCE

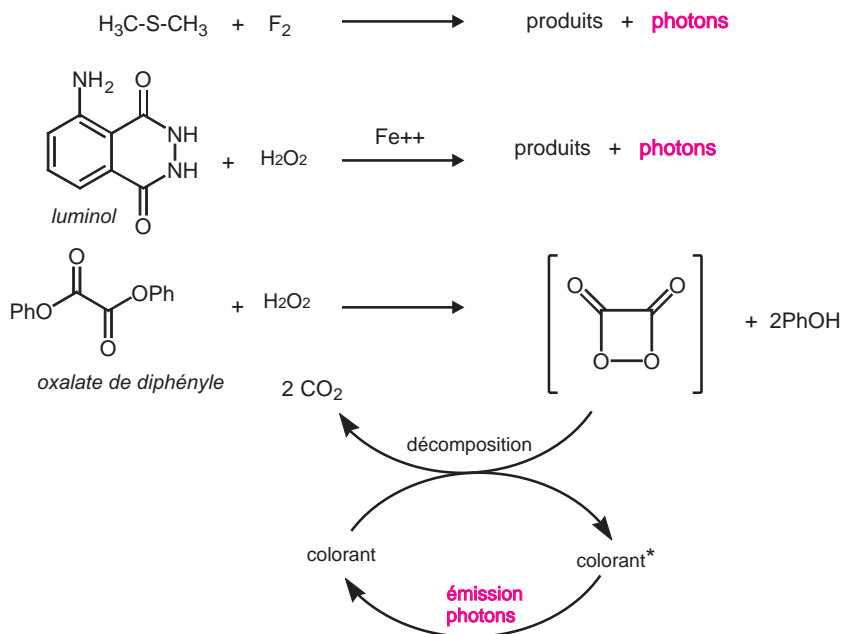


Figure 11.14 Exemples de réactions de chimiluminescence.

La nature des produits de réaction est quelquefois mal connue. Le luminol émet une intense lumière « bleu électrique ». Quant à l'oxalate de diphényle il permet d'obtenir, suivant le colorant utilisé, des émissions dans des couleurs très variées.

La *chimiluminescence* est un cas particulier de la phosphorescence. Dans ce cas les molécules excitées sont directement produites au cours d'une réaction chimique, et ce dans un état menant à une phosphorescence. Ainsi le fluor, dans l'exemple de la figure 11.14, agit comme un oxydant puissant pour transformer le diméthylsulfure. Une partie de l'énergie libérée par cette réaction est émise sous forme de lumière.

■ Le luminol et l'oxalate de diphényle sont deux composés très classiques utilisés dans diverses applications allant des dispositifs lumineux de secours sans électricité aux cerceaux, colliers et bâtons lumineux vendus dans les fêtes populaires nocturnes. Les réactions mises en jeu sont toutes des oxydations par le peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée).

Ces réactions sont à la base de nombreux dosages d'une très grande sensibilité. Si l'utilisation du luminol pour doser le fer ferreux ou le peroxyde d'hydrogène peut paraître anecdotique, il existe un certain nombre d'applications importantes de la chimiluminescence en analyse chimique, telles celles qui mettent à profit l'ozone comme réactif d'oxydation.

Ainsi, cet oxydant puissant permet de doser le monoxyde d'azote (oxydé en dioxyde d'azote) avec l'aide d'appareils automatisés qui disposent d'un générateur d'ozone incorporé (fig. 11.15). Le champ d'application de ce dosage est plus vaste qu'il n'y paraît car il va de l'étude des atmosphères polluées (on sait transformer quantitativement le dioxyde d'azote en monoxyde d'azote), aux dosages de la quantité d'azote totale d'un échantillon organique, à condition qu'il ait été transformé par une combustion préalable afin que cet élément passe à l'état de dioxyde d'azote.

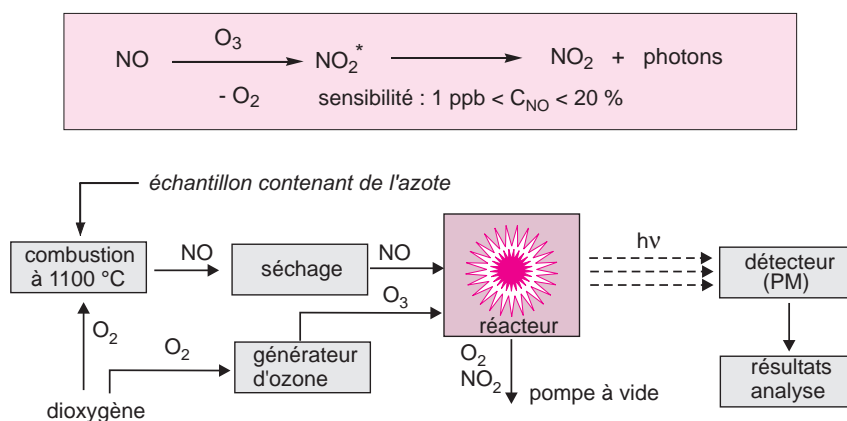


Figure 11.15 Schéma de principe d'un analyseur basé sur la luminescence du monoxyde d'azote.

Cet appareil permet de repérer l'émission de lumière à partir de tout composé contenant l'élément azote. Installé en sortie de colonne d'un chromatographe en phase gazeuse, l'appareil devient un détecteur sélectif.

Il existe d'autres appareils, fonctionnant sur ce même principe, pour doser l'élément soufre d'abord transformé en SO₂ par combustion en présence de dioxygène (fig. 11.16), puis réduit en sulfure d'hydrogène (H₂S) avant d'être finalement ré-oxydé par l'ozone (étape de chimiluminescence).

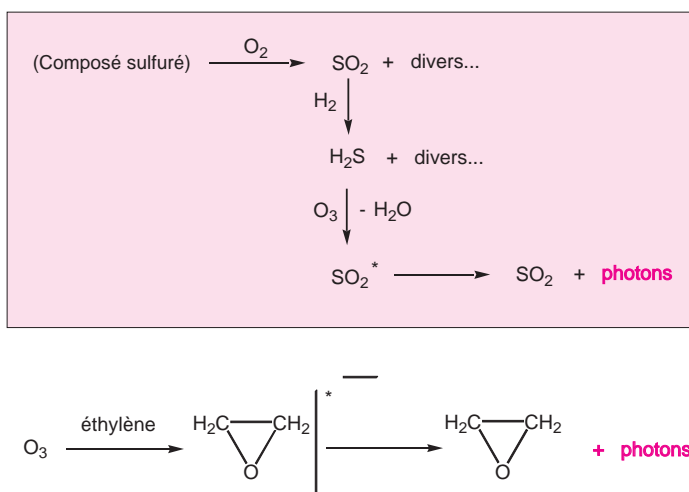


Figure 11.16 Réactions de chimiluminescence faisant intervenir l'ozone. L'encadré résume le principe de la transformation d'un composé sulfuré en dioxyde de soufre à l'état excité, par l'ozone. La dernière réaction peut s'appliquer au dosage de l'ozone comme de l'éthylène.

En chromatographie en phase gazeuse, certains détecteurs, sélectifs pour les éléments S et N, font appel à ce principe (fig. 11.17).



Figure 11.17 Analyseur de soufre et d'azote. Modèle 7 000 NS reproduit avec l'autorisation de la société Antek. Cet appareil réunit deux techniques de luminescence : l'azote est dosé par chimiluminescence (voir diagramme, figure. 11.13) et le soufre par fluorescence de SO_2 (excitation UV).

Inversement l'ozone peut à son tour être dosé par chimiluminescence en présence d'éthylène (fig. 11.15).

Le luminol, dont la chimiluminescence en présence de peroxyde d'hydrogène peut être également catalysée par la peroxydase du radis noir (HRP, *horseradish peroxidase*), a trouvé une application dans la mise au point de tests ELISA (cf. § 17.7). L'intensité lumineuse qui apparaît, stable durant quelques minutes, rend la méthode extrêmement sensible pour effectuer des dosages sur une gamme étendue de concentrations, peu habituelle pour ce genre de tests.

■ **Chimiluminescence et enzymologie.** Certains réactifs spécialement préparés libèrent sous l'action d'un enzyme spécifique des intermédiaires instables dont la décomposition est accompagnée d'une émission de lumière. On peut ainsi quantifier avec précision les phosphatases alcalines ou la beta-galactosidase.

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.moleculardevices.com

www.thermo.com

www.varianinc.com

www.biotek.com

www.perkinelmer.com

www.tecan.com

www.omnilab.ch

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 11.1

Le fer ferreux catalyse l'oxydation du luminol par le peroxyde d'hydrogène. L'intensité de la chimiluminescence qui en suit croît linéairement avec la concentration du Fe(II) dans la plage allant de 10^{-10} à 10^{-8} M. Pour doser une solution de concentration inconnue en fer(II), on en prélève 2 mL et on ajoute 1 mL d'eau ainsi que 2 mL de peroxyde d'hydrogène dilué et enfin 1 mL d'une solution alcaline de luminol.

Le signal de luminescence émis, intégré sur une période de 10 s, est de 16,1 (unités arbitraires). Dans un second essai on prélève 2 mL de la solution inconnue en fer(II), et on y ajoute 1 mL d'une solution à $5,15 \times 10^{-5}$ M en fer(II) ainsi que les mêmes quantités de peroxyde d'hydrogène et de luminol que dans l'essai précédent. Le signal est de 29,6 (mêmes unités).

Calculer la concentration molaire en fer(II) dans la solution à doser.

Exercice 11.2

Une solution de 9-aminoacridine dans l'eau, conduit à une intensité de fluorescence qui, mesurée à 456 nm, est de 60 % par rapport à un témoin de fluorescence externe. Un échantillon de ce composé dont la concentration est de 0,1 ppm dans le même solvant, conduit, dans les mêmes conditions, à une fluorescence de 40 % (l'eau présente une fluorescence négligeable).

Calculer la valeur de la concentration de l'échantillon en ppb.

Exercice 11.3

Le 3,4-benzopyrène est un hydrocarbure aromatique dangereux qui peut être présent dans l'air pollué. Il est dosable par fluorimétrie, en solution dans l'acide sulfurique dilué. La longueur d'onde d'excitation est de 520 nm et la mesure s'effectue à 548 nm.

On fait barboter 10 L d'air contaminé dans 10 mL d'acide sulfurique dilué. La fluorescence de 1 mL de cette solution, mesurée avec un fluorimètre monofaisceau à 548 nm, est de 33,3 (unités arbitraires).

Deux standards, l'un contenant 0,75 mg et l'autre 1,25 mg de 3,4-benzopyrène par mL de cette même solution sulfurique diluée, conduisent pour 1 mL aux valeurs de 24,5 et 38,6 (même unité). Dans les mêmes conditions de mesure ce fluorimètre, pour un échantillon ne contenant pas de 3,4-benzopyrène, indique 3,5.

Calculer la masse de 3,4-benzopyrène par litre d'air.

Exercice 11.4

On se propose de doser la concentration en quinine d'une boisson commerciale par fluorimétrie. La longueur d'onde d'excitation est de 350 nm et la longueur d'onde de mesure de 450 nm.

À partir d'une solution A de quinine à $0,1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, on fait une série de 5 solutions standards pour établir une courbe d'étalonnage.

solution	volume de A	H ₂ SO ₄ (0,05 M)	Fluorescence (unités arbit.)
standard 1	20	0	182,0
standard 2	16	4	138,8
standard 3	12	8	109,2
standard 4	8	12	75,8
standard 5	4	16	39,5
blanc analytique	0	20	0,0

On prélève ensuite 0,1 mL de la boisson à doser que l'on dilue à 100 mL avec H₂SO₄ 0,05 M. Le signal est de 113 pour cette solution.

- Trouver, par régression linéaire, l'équation de la droite d'étalonnage.
- Quelle est la concentration en quinine exprimée en $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ puis en ppm ?

Exercice 11.5

Le test de sensibilité des fluorimètres consiste à mesurer l'intensité de fluorescence du pic de diffusion Raman d'une cellule de 1 cm de trajet optique remplie d'eau.

Si la longueur d'onde d'excitation est réglée à 250 nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de $3\,380 \text{ cm}^{-1}$) ?

Chapitre 12

Spectrométrie de fluorescence X

La fluorescence X est une propriété spectrale des atomes exploitée couramment en analyse pour obtenir des renseignements qualitatifs ou quantitatifs sur la composition élémentaire de toutes sortes de mélanges. Le principe consiste à irradier l'échantillon soit par un faisceau de rayons X, soit par bombardement avec des particules, généralement des électrons ayant suffisamment d'énergie, pour que les atomes ainsi ionisés émettent un rayonnement de fluorescence également dans le domaine des rayons X. Le caractère universel du phénomène et la possibilité de faire un examen rapide sur des échantillons restés le plus souvent dans leur état d'origine, expliquent le succès de cette méthode d'analyse non destructive. Il existe un large choix d'analyseurs par fluorescence X, soit dédiés soit polyvalents, allant des appareils mobiles et peu encombrants, jusqu'aux spectromètres très performants, en passant par les sondes à rayons X adaptées aux microscopes électroniques à balayage pour faire des analyses ponctuelles ou de véritables cartographies élémentaires.

12.1 PRINCIPES DE BASE

Quand on irradie avec des photons ou qu'on bombarde avec des particules de grande énergie (entre 5 et 100 keV) un matériau servant de cible, celui-ci émet une fluorescence située dans le domaine des rayons X (fig. 12.1). Le spectre de cette photoluminescence comporte des radiations dont les longueurs d'ondes sont caractéristiques des atomes de ce matériau.

- Les modes d'excitation pour provoquer ce qu'on nomme la fluorescence X des atomes sont nombreux : photons ou particules (électrons rapides, protons, rayonnement α ...). Quelle que soit la méthode choisie, le rayonnement produit conduit néanmoins à des spectres faisant apparaître les mêmes radiations de fluorescence X.

L'application en analyse chimique est évidente : elle consiste à comparer le spectre de fluorescence X émis par l'échantillon inconnu à des spectres de références dont les compositions sont connues ou à des spectres d'éléments purs allant du bore ($Z = 5$) à l'uranium ($Z = 92$).

Les spectres dépendent très peu des combinaisons chimiques des éléments, ce qui a pour avantage de simplifier la préparation des échantillons correspondants.

Si l'analyse semi-quantitative des éléments présents ne pose pas de difficultés majeures, il en va autrement pour les analyses quantitatives pour la raison qu'une partie non négligeable du rayonnement émis à distance de la surface de l'échantillon, est ré-absorbée avant de sortir

de l'échantillon. À condition d'apprécier correctement l'influence de la matrice, surtout si la prise d'essai n'est pas homogène, les résultats peuvent être aussi précis qu'en absorption ou émission atomique.

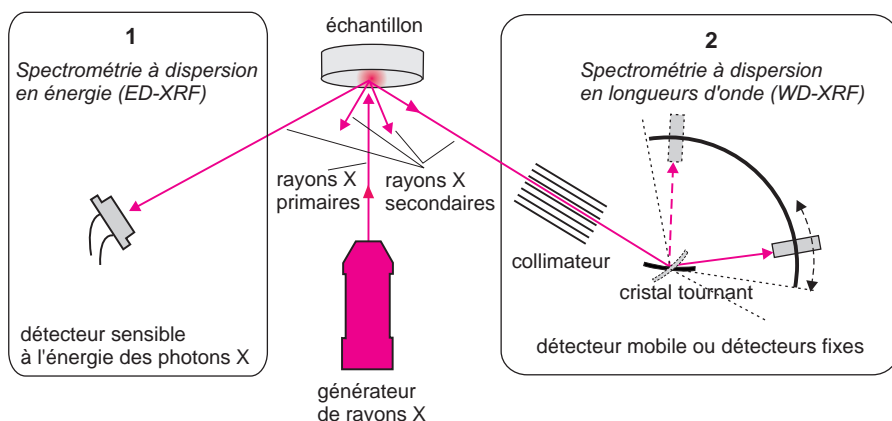


Figure 12.1 Fluorescence X.

L'échantillon, soumis à l'excitation d'une source primaire de rayons X émet un rayonnement de fluorescence qui peut conduire à deux types de spectres réunis ici sur la figure : 1) *Spectre en énergie (ED-XRF)* obtenu directement au moyen d'une diode dont le signal diffère selon l'énergie de chaque photon incident ; 2) *Spectre en longueur d'onde (WD-XRF)* obtenu par rotation d'un cristal faisant office de réseau (montage goniométrique comportant un (ou plusieurs) détecteur mobile. Cependant, énergie et longueur d'onde étant reliés (relation 12.2), on présente les spectres en unités d'énergie (eV), quel que soit le mode de détection.

12.2 LE SPECTRE DE FLUORESCENCE X

La fluorescence X d'un atome isolé résulte d'un processus en deux temps :

► **photoionisation de l'atome**, au cours de laquelle l'impact du photon extérieur incident se traduit par l'arrachement d'un électron interne de l'atome, tel un électron *K* si le photon a suffisamment d'énergie. Cet *effet photoélectrique* conduit à l'émission d'un *photoélectron* (fig. 12.2) et à un atome ionisé par suite d'une lacune interne.

■ L'énergie de chaque photoélectron a pour valeur la différence entre l'énergie du photon X incident et celle du niveau occupé initialement par l'électron éjecté. Le spectre énergétique des photoélectrons émis est obtenu par la méthode ESCA.

► **stabilisation de l'atome ionisé**, qui correspond à la ré-émission de tout ou partie de l'énergie acquise au cours de l'excitation. La lacune créée précédemment est suivie d'une réorganisation quasi instantanée (en 10^{-16} s) des électrons situés dans les différents niveaux de cet atome ionisé, ce qui le ramène très vite vers un état de faible énergie. Des réarrangements en cascade sont observés pour les atomes lourds, à la différence des éléments légers dont les électrons se répartissent sur un nombre plus restreint de niveaux de base.

Cette réorganisation fait naître des photons de fluorescence. En désignant par E_1 l'énergie de l'électron qui occupait la lacune considérée et par E_2 l'énergie de l'électron qui vient combler cette lacune, il pourra apparaître (probabilité comprise entre 0 et 1) un *photon de fluorescence* caractérisé par une fréquence ν , tel que :

$$h\nu = |E_2 - E_1| \quad (12.1)$$

■ L'interprétation ci-dessus est simplifiée, la fluorescence n'étant pas le seul processus permettant à l'atome de perdre son excédent d'énergie. D'autres phénomènes, dont la diffusion Rayleigh (diffusion élastique) et l'effet Compton (diffusion inélastique avec apparition d'électrons Compton), interviennent. La nature complexe du spectre n'empêche cependant pas la méthode d'analyse correspondante d'être basée sur un principe simple.

Chaque atome, à partir de $Z = 3$, conduit à un ensemble de radiations spécifiques, obéissant à des règles de sélection quantiques de ses électrons ($\Delta n > 0$, $\Delta l = \pm 1$). Les éléments hydrogène et hélium ne peuvent avoir de spectre de fluorescence X, n'ayant pas d'électron dans le niveau L . Du béryllium au fluor on note une seule transition de type $K\alpha$. Puis les atomes devenant plus gros le nombre de transitions possibles croît (75 pour le mercure) mais la probabilité de certaines est très faible. Heureusement il suffit pour caractériser un élément de repérer les quelques transitions les plus intenses (5 ou 6 au plus).

Pour l'ensemble des éléments, la fluorescence se situe dans une large plage allant de 40 eV à plus de 100 keV (31 à 0,012 nm).

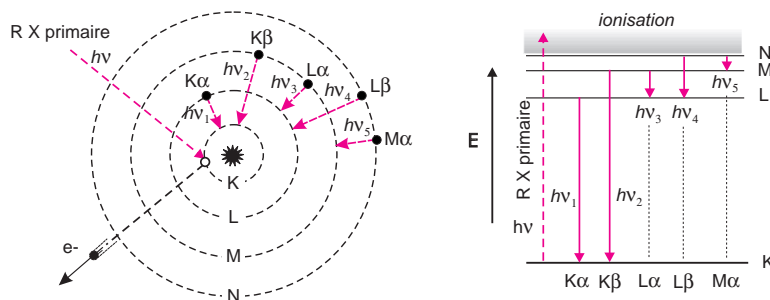


Figure 12.2 Schéma simplifié montrant l'origine de quelques transitions de fluorescence.

Sur l'image classique d'un atome de masse atomique moyenne, ont été représentées différentes réorganisations des électrons suite au départ d'un électron de la couche K . Ces transitions sont très peu affectées par la nature de la combinaison chimique dans laquelle se trouve l'atome. Ainsi, la raie $K\alpha_1$ du soufre passe de 0,5348 nm pour S^{6+} à 0,5350 nm pour S^0 , soit un écart d'environ 1 eV, comparable à la largeur naturelle des raies X.

La désignation précise des différentes transitions électroniques possibles fait référence aux niveaux d'énergie des orbitales de l'atome considéré, mais on utilise aussi une nomenclature simplifiée due à Siegbahn. Ainsi $FeK\beta_2$ symbolise, pour l'élément fer, la transition qui correspond au passage sur la couche K d'un électron venant d'une couche voisine ; β indique le passage $M - K$ et 2, l'intensité relative de la transition dans la série (1, plus intense que 2). Les transitions $K\beta$ sont approximativement six fois moins probables (donc moins intenses) que les transitions $K\alpha$ correspondantes, α marquant la « distance » la plus proche. Pour les niveaux L , M , qui sont multiples, la notation selon Siegbahn n'est pas toujours suffisamment explicite.

Compte tenu de la relation $E = hc/\lambda$ reliant l'énergie E d'un photon à sa longueur d'onde λ , on caractérise le rayonnement émis indifféremment par l'une ou l'autre de ces grandeurs, λ (nm ou Å ou E (eV ou keV). Les deux relations numériques de conversion les plus courantes sont :

$$\lambda_{(\text{nm})} = \frac{1240}{E_{(\text{eV})}} \quad \text{ou} \quad \lambda_{(\text{nm})} = \frac{1,24}{E_{(\text{keV})}} \quad \text{ou} \quad \lambda_{\text{\AA}} = \frac{12,4}{E_{(\text{keV})}} \quad (12.2)$$

12.3 MODES D'EXCITATION DES ÉLÉMENTS EN FLUORESCENCE X

Pour faire apparaître la fluorescence X de l'échantillon étudié, il faut une source de photons ou de particules d'énergies suffisantes. Généralement il s'agit de rayons X produits par des générateurs dont la puissance est variable ou pour quelques appareils portables de sources radio-isotopiques. En donnant au terme de fluorescence X le sens plus large d'émission X, on peut y adjoindre les procédés d'excitation faisant appel à des particules (e^- , α).

12.3.1 Générateurs à rayons X

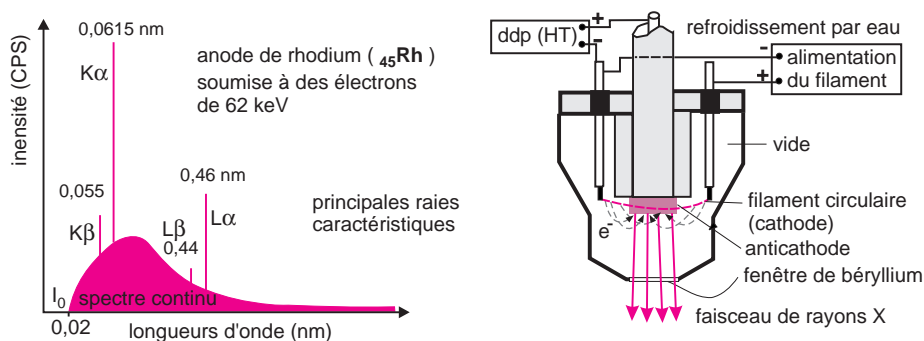


Figure 12.3 Spectre d'émission X d'une anticathode et schéma d'un tube à rayons X.

On distingue le spectre continu et le spectre de raies de l'anode. La partie continue de ce rayonnement qui dépend de la tension appliquée, est utile pour les applications nécessitant des puissances élevées. En revanche ce sont les raies, isolées au moyen de filtres, qui sont exploitées pour constituer les sources monochromatiques. Le refroidissement par eau est indispensable si le tube est de forte puissance (1-4 kW), ce qui n'est pas nécessaire pour les tubes de quelques watts des appareils de routine. Pour faire des sources monochromatiques (sans le rayonnement continu), on associe un monochromateur adapté ou on se sert d'un tube de ce type pour exciter une seconde cible dont la fluorescence relaie la première, sans rayonnement de freinage cette fois.

Dans une enceinte sous vide, un faisceau d'électrons, accéléré par une *ddp* pouvant atteindre 100 kV, frappe une cible servant d'anode (encore appelée *anticathode*) constituée d'un métal de numéro atomique compris entre 25 et 75. Celle-ci devient la source de rayons X *primaires*. Le spectre d'émission comporte une partie continue (rayonnement blanc, dit *de freinage*), dû aux électrons ralentis dans la cible et des radiations de fluorescence, très intenses, dont les longueurs d'onde sont caractéristiques du matériau de l'anode (fig. 12.3). La limite du spectre vers les courtes longueurs d'onde, λ_0 , dépend de la *ddp*. Elle peut être

calculée à partir des expressions 12.2. Pour disposer de raies d'émission énergétiques, utiles pour certaines applications, on trouve un choix de ces *tubes* à *RX* qui diffèrent par l'anode : rhodium (raie $K\alpha$ à $\lambda = 0,061$ nm ; $E = 20,3$ keV), tungstène (raie $K\alpha$ à $\lambda = 0,021$ nm ; $E = 59$ keV), gadolinium, etc.

Sachant que les détecteurs de rayons X sont devenus très sensibles, la puissance des générateurs classiques a tendance à diminuer.

■ Comme on le voit, un tel générateur de rayons X constitue lui-même une application de la fluorescence X. On ne s'étonnera donc pas que dans le passé, des spectromètres appelés à « excitation directe » ont été conçus en utilisant comme anticathode l'échantillon, pourvu qu'il soit conducteur du courant électrique ; la puissance requise pour faire apparaître la fluorescence, par action des électrons, est inférieure à celle qu'il faut fournir par impact de photons.

Pour les appareils portables (fig. 12.4), ont été développés des générateurs de *RX* miniaturisés de faible puissance (< 1 W). Les électrons nécessaires sont produits différemment soit par impact laser soit à partir d'un cristal pyroélectrique.



Figure 12.4 Générateur et détecteur de rayons X miniaturisés.

Ces sondes sont réservées aux appareils portables. Les modules de contrôle ou d'alimentation de ces sondes sont néanmoins plus volumineux (reproduit avec l'autorisation de la société Amptek).

Le générateur pris comme exemple (fig. 12.5) comporte un cristal pyroélectrique (contenant du tantale) orienté de telle sorte que sa face supérieure se dépolarise par chauffage et se re-polarise par refroidissement. Ainsi quand la température augmente, la face supérieure devient positive et attire les électrons du gaz de remplissage ionisé. Il apparaît un rayonnement blanc avec les raies de fluorescence du tantale ($L\alpha$ du $_{73}\text{La}$). Au refroidissement la face devient négative. Les électrons sont accélérés vers une électrode de cuivre. Le rayonnement comporte cette fois les raies de cet élément. La production de rayons X s'effectue de manière cyclique.

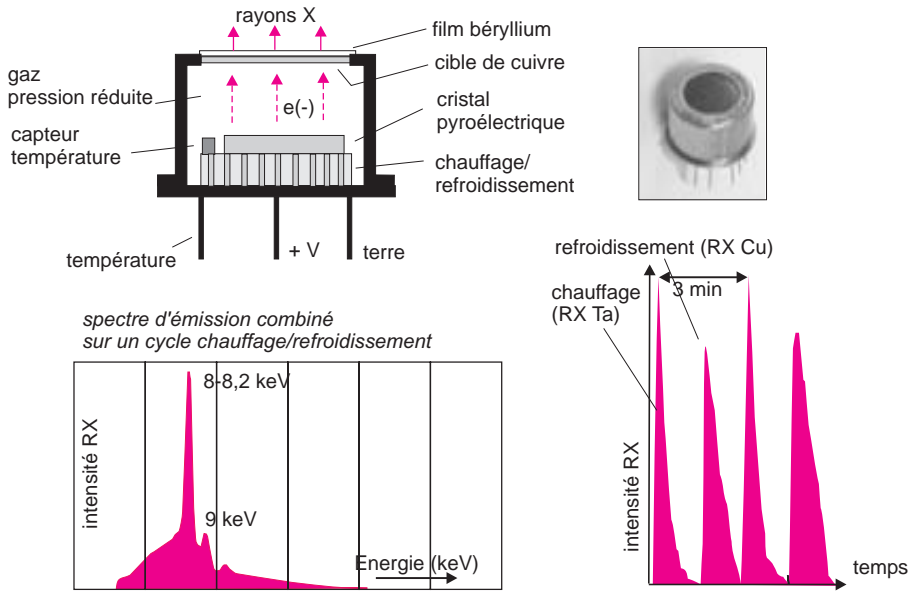


Figure 12.5 Générateur de rayons X de faible puissance.

Réservé aux appareils portables, de par leur faible encombrement (diam. 15 mm). La production de RX correspond sur le dessin à la phase refroidissement. Le cycle chauffage/refroidissement dure environ 3 min. Caractéristiques du modèle Amptek Cool-X.

12.3.2 Sources radio-isotopiques de rayons X

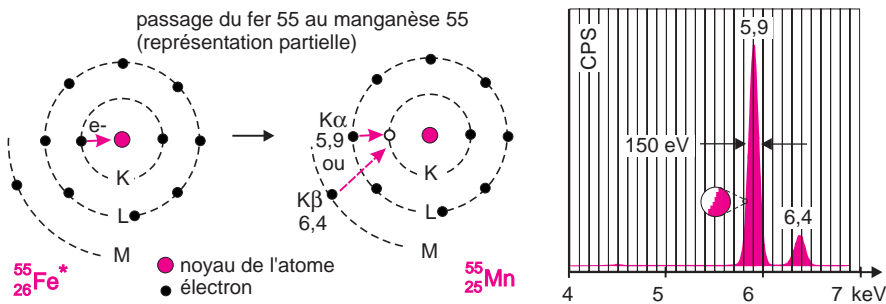
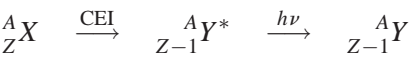


Figure 12.6 Source radioactive ^{55}Fe .

Enregistrement du spectre d'émission d'une source de ^{55}Fe obtenu en plaçant cette source dans le compartiment échantillon d'un spectromètre à dispersion en énergie. Les signaux correspondent à la fluorescence X du ^{55}Mn , c'est à dire au noyau fils du ^{55}Fe . La résolution de ce spectre, mesurée à mi-hauteur du pic principal est d'environ 150 eV.

À côté des générateurs précédents, il existe des sources de rayons X basées sur l'emploi d'un radio-nucléide qui se transforme par capture électronique interne (CEI). Ce mode de décomposition correspond au passage d'un des deux électrons du niveau K dans le noyau de cet atome. Il apparaît ainsi une lacune électronique, vite comblée par un électron plus

externe avec émission d'un photon de fluorescence X du noyau fils Y (fig. 12.6). Cette transformation s'écrit :



On connaît plusieurs radio-nucléides de ce type, dont les périodes suffisamment longues les rendent aptes à constituer des sources dont les énergies diffèrent (tableau 12.1). L'activité de ces sources isotopiques est généralement de quelques mCi, générant un flux de 10^6 à 10^8 photons/s/stéradian. Elles sont peu encombrantes et réservées aux instruments portables. Cependant elles nécessitent une autorisation de détention et peuvent poser des problèmes de transport, de stockage ou pour leur remplacement sachant qu'elles émettent en continu à la différence d'un générateur classique.

Tableau 12.1 Quelques sources radio-isotopiques à rayons X

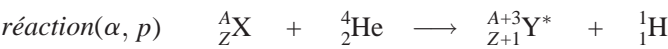
transition	période (ans)	raie X	λ (nm)	E (keV)
${}^{55}\text{Fe} \rightarrow {}^{55}\text{Mn}$	2,7	MnK α	0,21	5,9
${}^{57}\text{Co} \rightarrow {}^{57}\text{Fe}$	0,7	FeK α	0,19	6,4
${}^{109}\text{Cd} \rightarrow {}^{109}\text{Ag}$	1,3	AgK α	0,056	22,0

Il est également possible d'associer un radionucléide β^- avec un second élément à usage de cible qui fait office de l'anode d'un tube de rayons X conventionnel. Ainsi l'association ${}^{147}\text{Pm}/\text{Al}$ ($\tau = 2,6$ ans) émet un rayonnement X continu exploitable entre 12 et 45 keV.

12.3.3 Autres sources excitatrices

► **Emetteurs α .** Pour générer les rayons X, on utilise également des radionucléides α tel l'américium ${}^{244}\text{Am}$ ($\tau = 430$ années) ou le curium ${}^{244}\text{Cm}$. Au cours des collisions α , des électrons internes sont éjectés, provoquant la fluorescence X de la cible. L'intensité est de quelques dizaines de mCi. Cette source produit aussi un rayonnement γ de 60 keV.

■ Les sondes martiennes lancées en 1996 et durant l'été 2003 par le Jet Propulsion Laboratory ont porté sur la planète Mars des petits véhicules robotisés munis chacun d'un spectromètre APXS (Alpha Particle X-ray Spectrometer) dont la source contient du ${}^{244}\text{Cm}$ (30 mCi). L'ensemble source/détecteur est monté sur un bras télescopique pour s'approcher suffisamment des roches à analyser (fig. 12.16). Ce radioisotope provoque sur les éléments légers une réaction nucléaire de type (αp) faisant apparaître des protons d'énergie caractéristique et sur les plus lourds, la fluorescence X, apportant ainsi des renseignements se complétant pour la détermination de tous les éléments. Pour améliorer la résolution des détecteurs qui sont du type semi-conducteur (cf. §12.4), les spectres de fluorescence X sont enregistrés durant la nuit martienne, la température étant plus basse.



► **Électrons rapides.** L'émission de fluorescence X pouvant être provoquée par des électrons, il n'est pas étonnant que l'on puisse réaliser des analyses chimiques à partir des microscopes électroniques à balayage (MEB).

Quand l'objet est « éclairé » par le fin pinceau d'électrons très énergétiques nécessaires à la production d'une image, il se produit un certain nombre d'interactions, dans un petit volume en forme de poire qui entoure l'impact du faisceau (fig. 12.7). Il apparaît en particulier une émission de rayons X caractéristiques des atomes, en provenance de la zone située sous la surface soumise au bombardement des électrons. L'échantillon joue donc le rôle de l'anode d'un tube à rayons X.

C'est pourquoi beaucoup de microscopes électroniques comportent les accessoires nécessaires permettant d'analyser ce rayonnement de fluorescence. L'énergie du faisceau d'électrons est ajustée entre 20 et 30 keV, un compromis qui permet de faire apparaître les raies *K* ou *L* caractéristiques des éléments. Cette analyse, qui peut être quasiment ponctuelle (étude d'un volume d'environ $1\ \mu\text{m}^3$), est appelée *microanalyse X*.

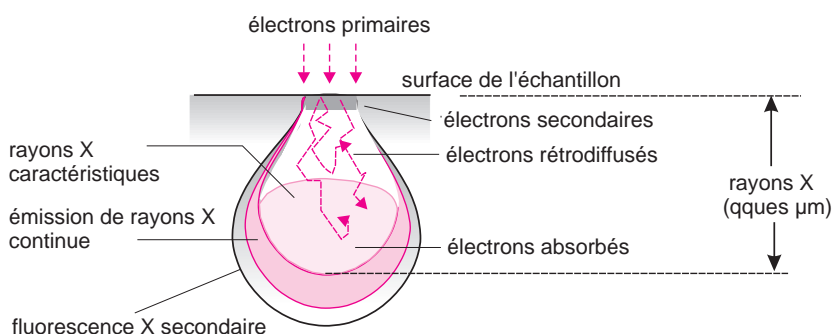


Figure 12.7 Poire d'interaction d'un faisceau d'électrons avec un matériau.

Différents phénomènes se produisent au sein du matériau. Il en résulte une émission complexe dans laquelle on peut différencier l'origine des divers rayonnements recueillis. Si l'énergie est élevée, les rayons X sont formés plus profondément dans la matière. Il sera donc plus difficile de les détecter.

12.4 DÉTECTION DES RAYONS X

Contrairement aux détecteurs photoélectriques, les détecteurs pour rayons X sont des transducteurs qui comptent les photons individuels. Ils fonctionnent avec d'autant plus d'exactitude que le flux de photons est faible. Les deux types les plus courants sont :

- le **transducteur à gaz** fonctionnant comme un *compteur proportionnel*. Chaque photon X provoque une ionisation dans un mélange de gaz (ex. argon/méthane) donnant une *hauteur d'impulsion* qui est proportionnelle à son énergie (fig. 12.8).
- le **transducteur à semi-conducteur** (*compteur à scintillations*). Chaque photon X augmente la conductivité de la zone active (la jonction) d'un capteur au silicium dopé avec du lithium (1 électron pour environ 3,6 eV). On diminue son bruit de fond en le maintenant à basse température par de l'azote liquide ou par effet thermoélectrique (effet Peltier). Sa face d'entrée est protégée par un film de béryllium de quelques μm (transparent pour $Z > 11$) (fig. 12.8). Dans l'un ou l'autre cas l'impulsion fournie par le détecteur permet de remonter à l'énergie du photon incident.

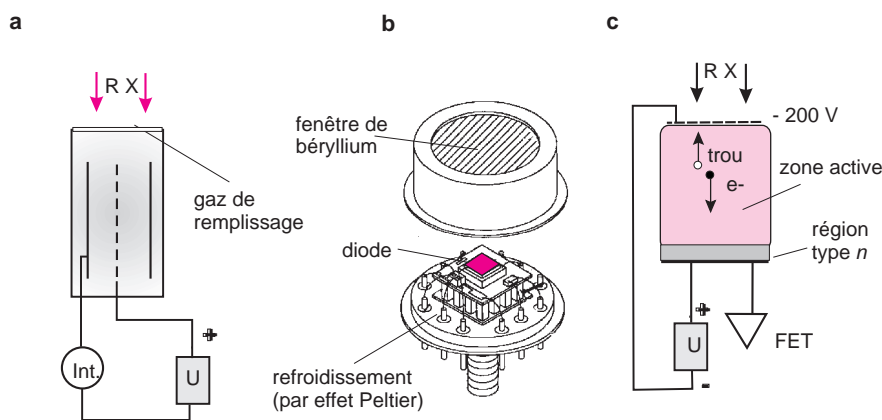


Figure 12.8 Les deux catégories de détecteurs utilisés pour la spectrométrie de fluorescence X à dispersion en énergie.

a) Compteur proportionnel utilisé en mode impulsif; b) modèle de détecteur à diode Si/Li refroidie (détecteur modèle XRT 100T de la société Amptek); c) principe de fonctionnement d'un détecteur à scintillation comportant un cristal semi-conducteur polarisé en inverse et présentant une zone active de volume important. Chaque photon incident génère un nombre variable de paires électron-trou. Le rendement quantique très élevé autorise l'emploi de sources primaires de rayons X de faible puissance (quelques watts ou sources radio-isotopiques).

■ Pour classer les photons avec une meilleure précision on en limite le nombre (environ 10 000/s) en diminuant, si nécessaire, l'intensité de la source. L'informatique de l'appareil doit en particulier identifier sans erreur l'énergie des photons « empilés », c'est-à-dire arrivant ensemble. La résolution des appareils est mesurée par la largeur à mi-hauteur de la raie $K\alpha$ du manganèse émise par une source radioactive de ^{55}Fe , (fig. 12.6). La résolution des appareils à dispersion d'énergie est d'une centaine d'eV, bien supérieure à la largeur naturelle des raies.

Après avoir défini une largeur d'acquisition de 10 à 20 keV, l'analyseur multi-canaux (2 000 par exemple), va comptabiliser pendant toute la durée de la mesure (plusieurs minutes) les impulsions libérées par les photons reçus. Chaque photon sera classé dans un canal d'énergie correspondant à un intervalle de quelques eV. Il va en résulter un spectre construit comme un histogramme (fig. 12.6). Ces détecteurs conduisent à faire une analyse simultanée sur toute l'étendue spectrale, d'autant meilleure que l'acquisition des signaux est faite sur un laps de temps t plus important (la sensibilité croît comme \sqrt{t}). L'étalonnage en énergie des radiations est souvent effectué avec la transition $K\alpha$ du cobalt utilisé comme référence externe.

12.5 LES DIVERSES CATÉGORIES D'INSTRUMENTS

Les spectromètres de fluorescence X sont classés en deux catégories suivant que le spectre est obtenu par un procédé classique d'analyse des longueur d'onde (« WD-XRF ») ou au contraire basé sur l'énergie des photons émis par l'échantillon (« ED-XRF ») (fig. 12.9). À la première catégorie appartient un groupe particulier d'appareils munis de filtres (type monocal) dédiés à des mesures spécifiques.

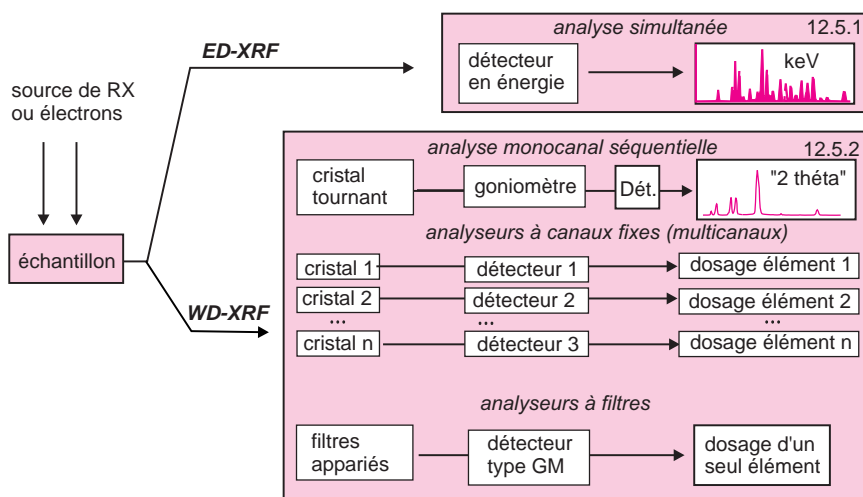


Figure 12.9 Les diverses approches permettant d'obtenir des spectres ou des résultats de fluorescence X.

Sur la figure sont indiqués les n° des paragraphes correspondants du texte.

12.5.1 Appareils à dispersion en énergie (EDXRF) – Système simultané

Ayant un faible encombrement, ces appareils sont réservés à l'analyse qualitative et aux dosages de routine (figures 12.10 et 12.11). Le spectre est obtenu en faisant appel à un détecteur installé à proximité de l'échantillon, qui permet de déterminer l'énergie de chaque photon de fluorescence capté sous forme d'une impulsion. Ces appareils sont équipés d'un tube à rayons X de faible puissance (environ 10 W) ou d'une source radioactive pour les appareils de terrain.



Figure 12.10 Appareil à dispersion d'énergie.

Spectromètre comportant un tube à rayons X de faible puissance, représentatif de nombreux appareils de ce type (modèle EX-310S reproduit avec l'autorisation de la société Jordan Valley - USA). Le détecteur utilisé est un compteur proportionnel à gaz.

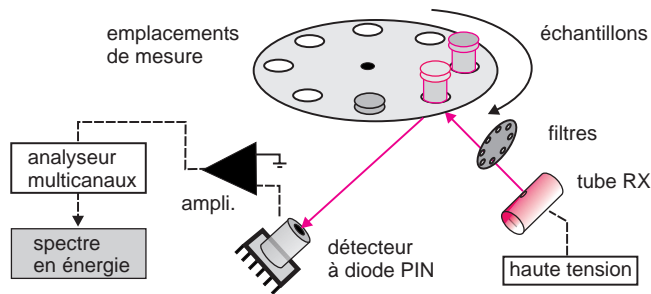


Figure 12.11 Agencement des différentes parties d'un spectromètre de fluorescence X à dispersion en énergie, en prenant comme exemple le modèle MiniPal de la société Philips analytical.

12.5.2 Appareils à dispersion en longueur d'onde (WDXRF)

Dans cette seconde catégorie de spectromètres, connus pour leur très bonne résolution spectrale, le rayonnement de fluorescence de l'échantillon, traverse un collimateur constitué par de longs feuillets métalliques (fentes de Sollers), puis vient frapper un cristal taillé de telle façon que les atomes constitutifs forment des plans parallèles à la surface (figures 1 et 13). Ces plans distants entre eux de d , se comportent comme une succession de miroirs parallèles, dont chacun permet d'atteindre presque 100 % de réflexion si l'angle d'incidence θ est le même que l'angle d'observation de la lumière réfléchie (fig. 12.12). La combinaison de ces miroirs décalés de la distance d a le même effet qu'un réseau : seules seront observées les radiations dont la longueur d'onde satisfait à la condition de Bragg (n étant un entier appelé ordre de diffraction).

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (12.3)$$

cristal	plan (indice de Miller)	$d(\text{\AA})$
topaze	303	1,356
fluorure de lithium	200	2,01
silicium	111	3,14
graphite	001	6,69
ac. oxalique	001	5,85
mica	002	9,96
stéarate de plomb		51

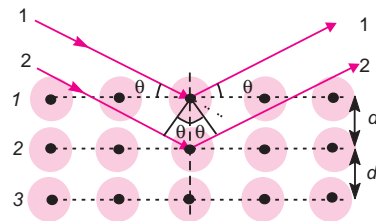


Figure 12.12 Quelques cristaux réflecteurs montés dans les goniomètres des spectromètres dispersifs en longueur d'onde et relation de Bragg.

Pour que les deux rayons 1 et 2 soient en phase, la différence de trajet optique doit être un multiple de λ . Quand cette condition est respectée entre les plans 1 et 2, elle l'est aussi pour tous les autres plans et l'effet global est donc renforcé. C'est le principe des interférences constructives. Chaque cristal permet d'explorer une plage de longueurs d'onde. Plus celle-ci est grande, plus le cristal choisi doit avoir une distance inter réticulaire importante, mais plus sa dispersion angulaire est petite.

Pour des raisons de construction, θ peut varier en général de 5 à 80°. Une valeur élevée de d permet d'observer de plus grandes longueurs d'ondes, mais cependant la résolution de l'instrument est liée au pouvoir dispersif $d\theta/d\lambda$, que l'on calcule en différentiant l'expression 12.3. Celui-ci est inversement proportionnel à d :

$$\frac{d\theta}{d\lambda} = \frac{n}{2d \cos \theta} \quad (12.4)$$

Parmi les spectromètres de ce type on distingue :

- **les analyseurs séquentiels** qui comportent un montage goniométrique permettant au détecteur et au cristal d'effectuer des rotations synchronisées 2θ et θ , au 1/1 000 de degré d'angle (fig. 12.13). Ces appareils sont réservés aux dosages des éléments non routiniers.

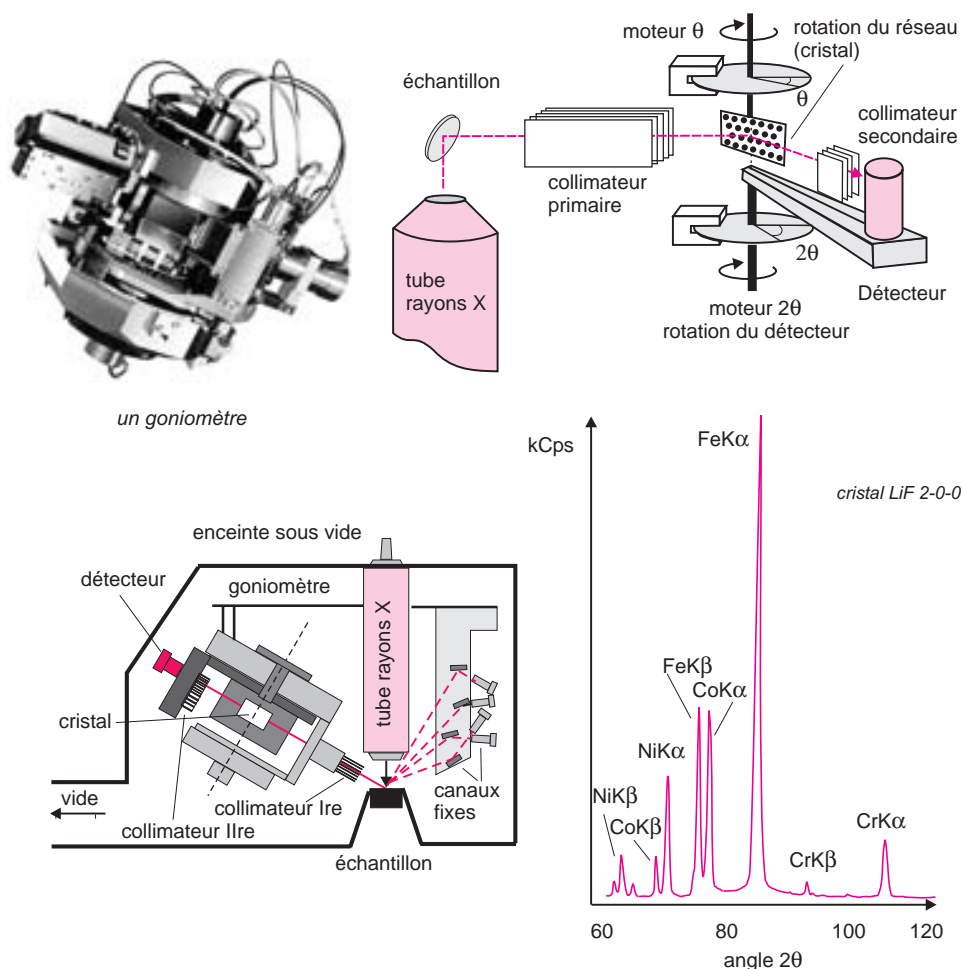


Figure 12.13 Deux modèles de spectromètre séquentiel à cristal.

En haut, dessin inspiré de l'appareil SR300 de la société Siemens. Le collimateur primaire canalise le faisceau de rayons X, produits par une source puissante. Le collimateur secondaire sert à éliminer toute la lumière diffractée qui ne serait pas parallèle à la direction 2θ dans laquelle se trouve le détecteur. Ces pièces sont constituées de feuillets métalliques parallèles. En bas, dessin inspiré du modèle ARL 9800, réunissant à la fois un montage goniométrique et des canaux fixes formés d'un couple cristal/détecteur pour doser des éléments prédéfinis ; à droite aspect d'un spectre enregistré en fonction de l'angle 2θ . Les détecteurs sont des compteurs à flux gazeux.

- **les appareils à canaux fixes.** La relation de Bragg montre qu'en choisissant un cristal (donc d) et en fixant l'angle de détection (donc la valeur de θ), on isole les radiations de longueur d'onde λ qui satisfont la condition de Bragg. Partant de ce principe on peut

installer autour de l'échantillon plusieurs dizaines d'ensembles cristal-détecteur, chaque couple (d, θ), permettant d'isoler une longueur d'onde, donc de repérer un élément pré-défini avec une grande sensibilité. Ces appareils permettent alors des analyses simultanées de plusieurs éléments (fig. 12.13).

Les transitions peu énergétiques des éléments jusqu'au phosphore ($Z = 15$), imposent d'opérer sous vide d'air. La résolution (en eV), peut atteindre quelques dixièmes d'électron-volt. Il existe des modèles de ce type qui sont adaptés aux microscopes à balayage.

12.5.3 Appareils à filtres (monocanal fixe)

Il s'agit d'instruments robustes souvent installés sur site pour le contrôle en continu d'une production industrielle.

Pour doser un élément en ligne de fabrication à partir d'une seule transition caractéristique, la méthode consiste à relier la concentration cherchée à la différence entre deux comptages. Le premier est obtenu en interposant un *filtre de transmission* entre l'échantillon et le détecteur, pour laisser passer la radiation caractéristique de l'élément cherché et le second en interposant un *filtre d'absorption*, pour arrêter cette même radiation. On pourra, par exemple, quantifier le cuivre à partir de sa raie $K\alpha$, en utilisant deux filtres l'un de nickel et l'autre de cobalt.

La fluorescence propre des filtres apporte des limitations à cette méthode réservée aux dosages de routine.

12.6 PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Il y a lieu de tenir compte de l'absorption des rayons X primaires et de la fluorescence qui est partiellement réabsorbée (le *quenching* optique par les éléments présents).

■ L'absorption de la matrice peut provoquer soit une sous-évaluation du résultat par quenching optique, soit une surévaluation lorsque certaines radiations de fluorescence provoquent une excitation secondaire d'autres éléments présents. Par exemple, la présence de fer avec de l'aluminium provoque une intensification de la fluorescence de ce dernier parce que la fluorescence du fer excite à son tour celle de l'aluminium.

- Pour les échantillons liquides, il n'y a pas de préparation particulière avant analyse. Un petit volume d'échantillon est placé dans une coupelle dont le fond est constitué d'un film de polypropylène ou de mylar (polyester) très peu absorbant aux rayons X. Ainsi la profondeur d'absorption atteint 1 cm pour les hydrocarbures.
- Pour les échantillons solides, en revanche, surtout si les matrices sont mal connues, une transformation préalable est souhaitable. En effet la fluorescence mesurée pour les matériaux massifs ne concerne qu'une épaisseur de quelques micromètres sous la surface. Cette épaisseur analysée dépend à la fois de la composition du solide et de l'angle d'incidence des rayons X primaires : elle va de quelques angströms (si incidence rasante), à un demi-millimètre. Toute hétérogénéité superficielle se traduit donc par des variations importantes sur le résultat. C'est la raison principale du surfacage avant analyse.

■ Les deux techniques de préparation des échantillons solides sont la minéralisation et le pastillage. La minéralisation consiste à mélanger un peu de l'échantillon réduit en poudre avec du tétraborate de lithium ($\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$), et divers additifs. Le verre obtenu par fusion dans un creuset électrique à chauffage par induction, appelé perle, constitue une matrice d'éléments légers, donc transparente aux rayons X. Le pastillage avec une presse hydraulique est une alternative à la fusion. Pour assurer la cohésion de la pastille, on ajoute une cire (polymère organique formé d'éléments légers).

12.7 ABSORPTION DES RAYONS X - DENSIMÉTRIE X

La pénétration des rayons X dans la matière conditionne indirectement l'analyse par fluorescence X. Il est donc utile de rappeler la loi qui régit cette absorption.

L'intensité P du rayonnement qui émerge après avoir traversé un matériau dont l'épaisseur est x (cm) et dont le *coefficient d'absorption linéique* est μ (cm^{-1}) pour la longueur d'onde considérée, vaut, par rapport à sa valeur initiale P_0 et pour un angle de pénétration de 90° :

$$P = P_0 \cdot \exp[-\mu x] \quad (12.5)$$

Cette expression découle de l'intégration de la forme élémentaire $dP = -\mu P dx$, semblable au postulat posé en ce qui concerne la loi de Beer-Lambert (voir § 9.9). On peut calculer μ pour tout matériau dont on connaît ρ , masse volumique (g/cm^3) et la composition, à partir d'une table donnant les *coefficients d'absorption (ou d'atténuation) massiques* des éléments qui le compose. On commence par établir le coefficient massique pondéré μ_M (cm^2/g) du matériau étudié. Ensuite on fait intervenir la densité du matériau, ce qui donne $\mu = \mu_M \rho$.

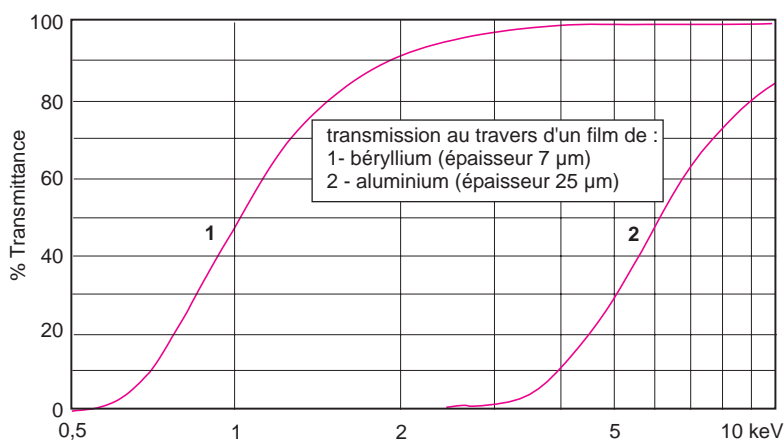


Figure 12.14 Densimétrie X. % de transmittance de deux films d'éléments légers. Le film de 7 μm de béryllium est souvent utilisé comme matériau pour confectionner les fenêtres des détecteurs en énergie. On remarque que pour une radiation de 1 keV, (Na $K\alpha$ par ex.) l'atténuation apportée par ce film est encore de 50 %.

La figure 12.14 montre qu'un film de béryllium, tel ceux qui servent de fenêtre pour les détecteurs, est opaque au rayonnement émis par les éléments les plus légers ($E < 1$ keV

pour $Z < 10$). Le coefficient d'absorption linéique d'un matériau décroît lorsque la longueur d'onde diminue. On comprend mieux pourquoi pour améliorer le dosage des éléments légers dans les liquides on opère sous atmosphère d'hélium et sous vide dans le cas des solides.

- La relation 12.5 permet de calculer qu'un film d'aluminium ménager de $12\text{ }\mu\text{m}$ d'épaisseur ($\rho = 2,7\text{ g/cm}^3$) absorbe 57 % de l'intensité de la transition : $\text{TiK}\alpha$ ($\mu_{\text{M}} = 264\text{ cm}^3/\text{g}$) mais 1 % seulement pour la transition $\text{AgK}\alpha$ ($\mu_{\text{M}} = 2,54\text{ cm}^3/\text{g}$).

12.8 ANALYSE QUANTITATIVE PAR FLUORESCENCE X

La relation entre la concentration massique de l'élément à analyser et l'intensité mesurée d'une de ses raies caractéristiques est complexe. Dans le cas d'analyses de traces, différents modèles ont été développés pour corrélérer la fluorescence à la concentration atomique. On doit apporter de nombreuses corrections dues aux effets interéléments, à l'excitation préférentielle, à l'autoabsorption, au rendement de fluorescence (les atomes lourds se dés excitent plutôt par conversion interne sans émission de photons), autant d'effets qui exigent que les échantillons de référence aient pratiquement même structure et même composition atomique pour tous les éléments présents. La difficulté d'une bonne analyse quantitative de fluorescence X se situe à ce niveau. Lorsqu'on opère sur un échantillon solide, il faut veiller à avoir une surface parfaitement propre, éventuellement polie, sachant que l'analyse ne concerne que la composition à proximité immédiate de la surface.

- La méthode se prête en analyse qualitative à l'identification automatique des raies, souvent agrémentée de présentations visuelles très sophistiquées sur fond de classification périodique multicolore. En analyse semi-quantitative, des logiciels conduisent à la composition approchée de l'échantillon sans nécessiter de standards de référence. En revanche, en analyse quantitative, les problèmes sont plus sérieux, l'étalonnage imposant des matrices en tout point comparables. De nombreuses corrections interviennent : du numéro atomique Z , de l'isotope A et de la fluorescence F (corrections ZAF).

12.9 APPLICATIONS DE LA FLUORESCENCE X

Initialement, la fluorescence X était surtout utilisée dans les industries traitant des métaux ou des alliages et d'une façon générale dans la grande industrie minérale (sidérurgie, industries des ciments, de la céramique, du verre). Cette méthode non destructive de l'échantillon qui ne nécessite pas ou très peu de préparation préalable, a, de plus, une plage dynamique étendue. Il est possible par exemple de doser sur une même prise d'essai deux éléments dont les concentrations sont de 50 % pour l'un et de quelques ppm pour l'autre. Les progrès dans la détection des photons de grande énergie ont amélioré la précision des analyses des éléments lourds qui peuvent être obtenues à partir de leurs raies K , et non plus de leurs raies L qui se situent dans la partie du spectre où les niveaux de bruit de fond sont élevés.

Avec la commodité des appareils actuels (fig. 12.15), son champ d'application s'est considérablement étendu. Il va des analyses qualitatives de routine, à des dosages qui atteignent la précision des méthodes par voie humide, en passant par des analyses semi-quantitatives,

soit en recherche et développement soit en contrôle de production. Des analyses semi-quantitatives sont possibles, sans standards de référence, par l'emploi de logiciels très performants.



Figure 12.15 Appareil portatif de terrain.

Cet instrument est représentatif d'une catégorie de spectromètres dispersifs en énergie équipé d'un générateur à rayons X sans source radio-active (reproduit avec l'autorisation de la société Niton, USA). La copie d'écran dont est muni cet appareil permet de rendre compte de ses possibilités à condition que l'étalonnage ait été parfaitement effectué.

Enfin la microanalyse X permet, pour les échantillons qui idéalement doivent être conducteurs de l'électricité, de dresser la cartographie de chaque élément au sein d'un objet hétérogène, observé avec un microscope électronique.

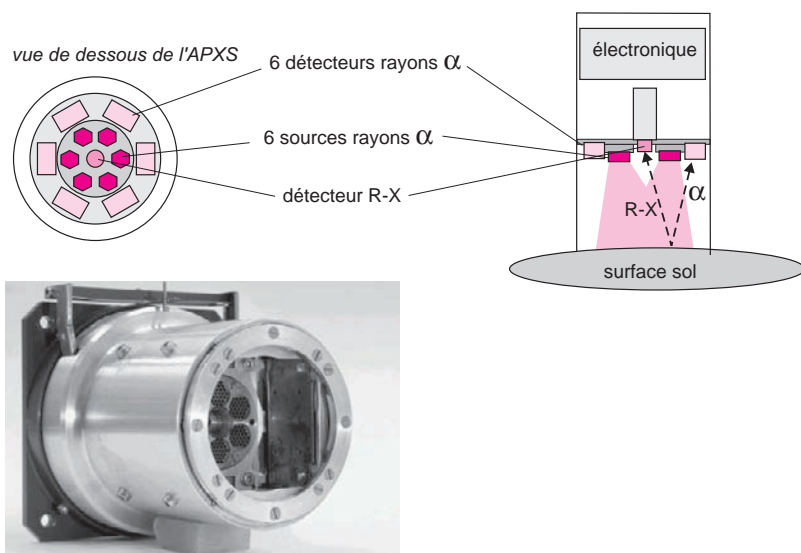


Figure 12.16 Analyse du sol de la planète Mars.

À l'avant du véhicule robotisé posé sur la planète en 2004 se trouve un bras télescopique portant le spectromètre « Athena » APXS, dont la partie extrême, représentée ici, est munie d'un ensemble sources/détecteurs dans le but d'analyser les éléments présents à la surface du sol sur une épaisseur inférieure à 100 microns et une surface d'une dizaine de cm^2 .

La liste serait longue s'il fallait indiquer toutes les applications de la fluorescence X en analyse. Industries photographiques, papetières, des semi-conducteurs (impuretés du silicium), pétrochimiques (S, P, Cl)... En géologie, toxicologie, environnement (poussières, fumées de combustion, pollution des terrains), gestion des déchets et des rejets (éléments lourds tels As, Cr, Cd ou Pb), analyse des « ultra-légers » (azote). Enfin pour des applications très actuelles, c'est par cette méthode que l'on fait le diagnostic plomb dans l'habitat (peintures et revêtements muraux) et qu'on analyse le sol de Mars (fig.12.16).

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.amptek.com

www.bruker-axs.de

www.panalytical.com

www.kevex.com

www.oxford-instruments.com

www.niton.com

www.spectrace.com

www.edax.com

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 12.1

- a)** Pourquoi le tableau des raies d'émission de fluorescence X ne commence-t-il qu'au lithium ?
- b)** Pour doser les éléments dont l'énergie du rayonnement émis est inférieure à 3 keV, il est nécessaire de purger l'air de l'appareil pour le remplacer par de l'hélium. Pourquoi ?

Exercice 12.2

Un tube à rayons X dont l'anticathode est en tungstène, sert de source dans un spectromètre de fluorescence X comportant un goniomètre équipé d'un cristal de tartrate d'éthylènediamine. Le plan de réflexion mis en jeu correspond à une distance interréticulaire de $d = 4,404$.

- a)** Calculer l'angle de déviation mesuré par rapport à la direction du rayon incident pour recueillir la raie de fluorescence $L\beta$ du brome ($\lambda = 8,126$) émise par un échantillon de bromure de sodium (on considère que l'observation se fait en réflexion du premier ordre).
- b)** Sachant que la longueur d'onde de la raie $K\alpha$ de l'anticathode de tungstène est de 0,209, calculer la tension accélératrice minimum des électrons du tube à rayons X pour faire apparaître cette raie.

Exercice 12.3

Pourrait-on se protéger efficacement des rayons X, en s'entourant d'un film d'aluminium ménager, d'épaisseur 12 μm ?

On fera le calcul du pourcentage de transmission (masse volumique de Al = 2,66 g/cm³) :

- pour la raie $K\alpha$ du titane (4,51 keV, $\mu_{\text{M Al}} = 264 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$),
- puis pour la raie $K\alpha$ de l'argent (22 keV, $\mu_{\text{M Al}} = 2,54 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$).

Exercice 12.4

Le soufre présente 2 raies de type K : $K\alpha_1 = 5,37216$ et $K\alpha_2 = 5,37496$.

- Quel est l'écart exprimé en eV entre ces deux raies ?
- Si on admet que la largeur naturelle à mi-hauteur de ces raies est de 5 eV, quelle conclusion peut-on en tirer ?
- Sachant que la position de la raie $K\alpha_2$ augmente de 0,002 lorsqu'on passe de S^{6+} à S^0 , montrer que cela n'a pas d'incidence sur le repérage de la raie exprimé en énergie.

Exercice 12.5

On veut déterminer le % massique de Mn présent dans une roche. On utilise l'élément Ba comme référence interne. Deux solutions solides d'étalonnage sous forme de perles au borax conduisent aux résultats suivants :

N° solution	% Mn (en masse)	rapport de comptage Mn/Ba
1	0,250	0,811
2	0,350	0,963
sol. à doser	?	0,886

Évaluer le pourcentage massique de Mn pour la solution à doser.

Exercice 12.6

Un appareil de fluorescence X à dispersion en longueurs d'onde est utilisé pour déterminer le pourcentage en masse de carbone compris entre 2 et 4 % dans de la fonte. Bien que l'atténuation de la raie $K\alpha$ du carbone soit importante dans le fer, un étalonnage linéaire peut être réalisé si la matrice (fonte) a pratiquement la même composition que les étalons. Sept étalons sont utilisés pour cet étalonnage. La composition en carbone de ces étalons est déterminée avec précaution par une méthode classique de référence. Les intensités en coups par seconde (cps) de la raie $K\alpha$ du carbone et les concentrations des étalons sont données dans le tableau suivant :

% m/m	2,32	2,93	3,45	3,89	2,87	3,80	3,46
cps	158	209	243	274	204	262	237

- Déterminer la relation entre l'intensité de la raie en cps et la composition des étalons en % massiques par régression linéaire.
- L'intensité de la raie du carbone, pour une fonte de composition inconnue, est évaluée à 233 cps. Calculer son pourcentage massique en carbone.

Exercice 12.7

Dosage de l'aluminium par spectrophotométrie de fluorescence X.

L'encre en poudre est un élément important dans les imprimantes, les télécopieurs et les photocopieurs. La composition et l'absence d'impuretés dans cette encre sont d'une grande importance pour la qualité de l'impression et la durabilité du matériel. C'est pourquoi on dose l'aluminium présent par fluorescence X à dispersion d'énergie.

L'appareil utilisé est doté d'un tube au rhodium et d'un détecteur haute résolution.

L'échantillon est compacté et introduit sous forme d'une pastille dans le compartiment échantillon. Les conditions d'analyse sont données dans le tableau ci-après :

élément	kV	μA	filtre	milieu	Durée (sec)
Al	6	900	aucun	hélium	60

Dans les conditions de l'analyse, on a purgé le compartiment échantillon pour remplacer l'air par de l'hélium. Sachant que dans les conditions de l'expérience, la masse volumique de l'air est égale à $0,54 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, que sa composition en % volumiques est de 80% de diazote et 20 % de dioxygène, et que les coefficients d'atténuation massique de l'azote et de l'oxygène sont respectivement égaux à $17,7$ et $27,2 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ à 6 keV , calculer :

- a) les pourcentages massiques en azote et oxygène dans l'air ;
- b) le coefficient d'atténuation massique pondéré de l'air ;
- c) le pourcentage d'énergie transmise par 10 cm d'air ;
- d) le pourcentage d'énergie transmise par 10 cm d'hélium à 300 K sous 1 atmosphère ($M = 4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, $\mu_m = 0,395 \text{ cm}^2 \cdot \text{g}^{-1}$).

Conclure.

On procède à l'étalonnage en introduisant de l'aluminium dans une matrice proche de celle de l'échantillon, matrice initialement dépourvue d'aluminium. On obtient les résultats suivants :

%m/m en Al	0,10	0,30	0,46	0,60	0,90
cps	24	37	48	56	75

- e) Donner la relation entre l'intensité de la raie émise en cps et le % en Al dans les étalons.
- f) Sachant que l'encre étudiée dans les mêmes conditions donne une intensité de raie émise égale à 38 cps , calculer, en pourcentage massique en Al, la composition de l'échantillon étudié.

Chapitre 13

Absorption atomique et émission de flamme

La spectrométrie d'absorption atomique (SAA) et l'émission de flamme (EF), encore appelée photométrie de flamme, permettent de doser dans pratiquement toute sorte d'échantillon, un ou plusieurs éléments pré-définis (métaux ou non-métaux) choisis dans une liste en contenant environ 70. Les appareils correspondants permettent, pour la plupart d'entre eux, d'exécuter des dosages en suivant l'une ou l'autre de ces méthodes, bien que le principe des mesures soit différent. La sensibilité permet d'atteindre pour certains éléments des concentrations inférieures au $\mu\text{g/L}$ (ppb). Les applications sont très nombreuses.

13.1 EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR UN ÉLÉMENT

Pour comprendre le principe de l'absorption atomique et l'émission de flamme on peut se reporter à une expérience due à Kirchhoff, vieille de plus d'un siècle, dans laquelle il a montré que les gaz incandescents absorbent aux mêmes longueurs d'onde que celles qu'ils peuvent émettre.

Lorsqu'on disperse la lumière d'un arc électrique (servant à l'époque de source de lumière blanche), avec un prisme, on obtient un spectre continu (fig. 13.1-1). Si on substitue à la source précédente un bec Bunsen dans lequel on projette un peu de chlorure de sodium, on obtient le spectre d'émission de cet élément formé de raies (images de la fente d'entrée) dont le doublet jaune bien connu et situé à 589 nm (fig. 13.1-2 et 13.2). Cette partie de l'expérience illustre l'*émission de flamme*. Enfin, si on associe sur le même trajet optique les deux sources précédentes, arc électrique puis flamme du bec Bunsen, on obtient un spectre qui, contrairement à la figure 13.1-1, comporte des raies sombres à l'endroit des raies d'émission du sodium (fig. 13.1-3). Ce « renversement des raies » résulte de la présence dans la flamme d'une large proportion d'atomes de sodium restés à l'état fondamental qui absorbent les mêmes fréquences que les atomes de sodium excités émettent. C'est une manifestation de l'*absorption atomique*.

- Parmi tous les analyseurs conçus pour faire des mesures quantitatives on trouve pour doser les traces de mercure dans les atmosphères polluées, un instrument apparenté à un colorimètre qui exploite ce phénomène. La source est une lampe à vapeur de mercure et la cellule de mesure est un tube transparent rempli de l'atmosphère à contrôler. Si des vapeurs

de mercure sont présentes sur le parcours optique, il y a absorption des radiations précisément émises par la lampe, ce qui conduit à une diminution de la lumière transmise, en relation avec la concentration en mercure.

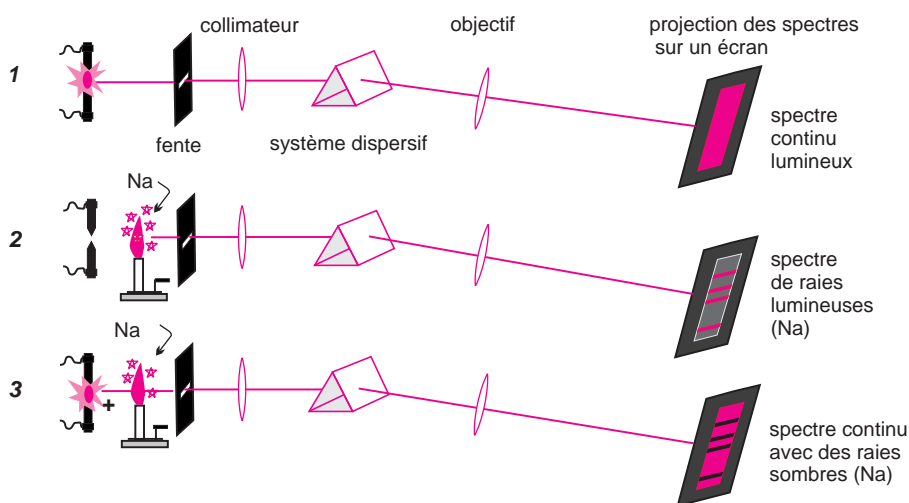


Figure 13.1 Expérience du « renversement des raies », de Kirchhoff.

Le schéma conventionnel du montage optique (collimateur, objectif) a été simplifié pour plus de clarté.

Cette expérience traduit l'existence d'états d'énergie potentielle parfaitement définis pour tout atome et qui dépendent de sa configuration électronique. Lorsqu'un atome à l'état libre est porté à température élevée ou irradié avec une source lumineuse du domaine du proche UV/Visible, on favorise le passage d'un de ses électrons externes, de l'état fondamental où il se trouve normalement, à un état excité. Ce transfert correspond à une absorption d'énergie. Inversement, lorsque l'atome revient spontanément à son état fondamental, il peut ré-émettre cet excédent d'énergie sous forme d'un ou plusieurs photons. Dans l'expérience précédemment décrite, la flamme provoque les transitions les plus probables de l'atome de sodium (fig. 13.2).

La loi de répartition de Maxwell-Boltzmann permet de calculer l'effet de la température sur chaque transition. En désignant par N_0 le nombre d'atomes à l'état fondamental et par N_e celui à l'état excité, on a :

$$\frac{N_e}{N_0} = g \cdot \exp \left[-\frac{\Delta E}{kT} \right] \quad (13.1)$$

T température absolue en kelvins

g rapport des poids statistiques des états **e** et **0** de l'élément considéré (nombre entier)

ΔE écart d'énergie (joules) entre les deux populations concernées **e** et **0**.

k constante de Boltzmann ($k = R/N = 1,38 \times 10^{-23}$ J/K)

Si ΔE est exprimé en eV et non en joules, la relation 13.1 devient :

$$\frac{N_e}{N_0} = g \cdot \exp \left[-11\,600 \frac{\Delta E}{T} \right] \quad (13.2)$$

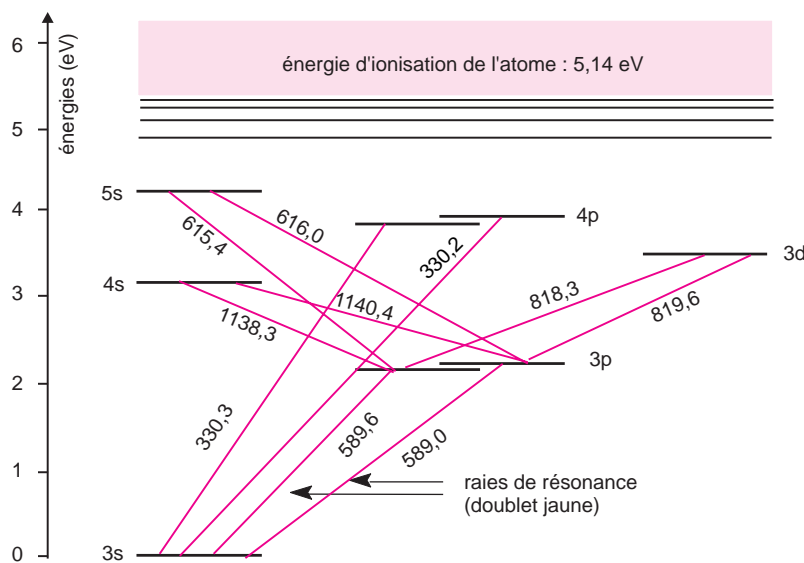


Figure 13.2 Quelques niveaux excités de l'atome de sodium
Représentation simplifiée des niveaux d'énergie de l'atome de sodium. Origine des différentes radiations émises, compte tenu des règles de sélection. Valeurs indiquées en nm.

Chaque transition atomique correspond à une émission ou une absorption d'énergie, répartie sur un intervalle très étroit de longueur d'onde, ce qui correspond à la *largeur naturelle de la raie*. Celles-ci dépendent de la température. Elle passe de 10^{-5} nm dans les conditions idéales à environ 0,002 nm à 3 000 K. En réalité les imperfections des spectroscopes sont responsables d'un élargissement bien plus grand de l'image des raies.

13.2 APPLICATION AUX APPAREILS ACTUELS

Pour doser un élément par l'une ou l'autre de ces méthodes, il doit être sous forme d'atomes libres. L'échantillon est donc porté dans l'appareil à une température d'au moins 2 000 °C afin de dissocier toutes les combinaisons chimiques dans lesquelles sont l'élément considéré ainsi que tout le reste de l'échantillon. Cette pyrolyse conduit à la concentration totale de l'élément sans permettre de connaître sa répartition entre plusieurs composés dans lesquels il se trouvait éventuellement à l'origine (c'est donc le contraire d'une analyse de spéciation).

Deux dispositifs thermiques coexistent : l'un est constitué par un brûleur alimenté par un mélange gazeux comburant / combustible, l'autre par une sorte de petit four électrique tubulaire. Dans le premier montage, qui convient pour la plupart des éléments, une solution aqueuse de l'échantillon est nébulisée puis entraînée à débit constant dans la flamme. Dans le second, l'échantillon est déposé dans un petit tube en graphite ouvert à ses deux extrémités, où il est volatilisé. Ce montage, plus coûteux, est beaucoup plus sensible pour les éléments réfractaires (V, Mo, Zr). Dans les deux cas le trajet optique source/détecteur traverse la zone contenant les atomes de l'élément passé à l'état libre (sorte de nuage formé d'un gaz d'atomes).

- En *absorption atomique*, la concentration est déduite de la mesure de l'absorption de la lumière par les atomes de l'élément restés à l'état fondamental lorsqu'ils sont éclairés par une source lumineuse convenable.
- En *émission de flamme*, au contraire, on mesure l'intensité des radiations émises par la fraction des atomes passée à l'état excité par simple effet thermique.

En absorption atomique comme en émission de flamme, la mesure d'intensité lumineuse est faite à une longueur d'onde spécifique de l'élément analysé.

■ L'émission de flamme désigne l'émission de photons par certains éléments lorsqu'ils sont soumis à une température de l'ordre de 2 000 à 3 000 °C. La technique, qui sert uniquement à faire des dosages, se distingue de l'émission atomique ; ce terme plus général concerne une autre méthode spectrale d'analyse, à la fois qualitative et quantitative, utilisant des sources thermiques à plasma atteignant des températures beaucoup plus élevées et une partie optique très performante.

13.3 ABSORPTION ATOMIQUE CONTRE ÉMISSION DE FLAMME

Les valeurs courantes des différents paramètres des expressions 13.1 et 13.2 montrent avec quatre exemples (tabl. 13.1) que les atomes demeurent pratiquement tous à l'état fondamental et cela d'autant plus que l'écart ΔE est plus grand et la température moins élevée.

Tableau 13.1 Rapport N_e/N_0 pour quelques éléments à différentes températures.

Élément	$\lambda(\text{nm})$	$E(\text{eV})$	g	2 000 K	3 000 K	4 000 K
Na	589	2,1	2	$1,0 \times 10^{-5}$	$6,0 \times 10^{-4}$	$4,5 \times 10^{-3}$
Ca	423	2,93	3	$1,2 \times 10^{-7}$	$3,6 \times 10^{-5}$	$6,1 \times 10^{-4}$
Cu	325	3,82	2	$4,8 \times 10^{-10}$	$7,3 \times 10^{-7}$	$3,1 \times 10^{-5}$
Zn	214	5,79	3	$7,3 \times 10^{-15}$	$5,7 \times 10^{-10}$	$1,5 \times 10^{-7}$

Il semblerait donc qu'il soit préférable, dans toutes les circonstances, de baser les mesures sur l'absorption atomique plutôt que sur l'émission de flamme, d'autant plus que les spectres d'absorption sont plus simples que les spectres d'émission. Cependant la matrice dans laquelle se trouve l'élément peut provoquer des interférences, des interactions chimiques, une instabilité des niveaux et des phénomènes annexes qui se produisent aux températures élevées (fig. 13.3) et qui rendent difficile la mesure de l'absorbance.

Avec les détecteurs actuels comportant un photomultiplicateur, il suffit, pour faire une mesure fiable, que le rapport N_e/N_0 soit supérieur à 10^{-7} .

L'expérience montre que l'émission de flamme est préférable pour 5 à 6 éléments. C'est ainsi que les métaux alcalins, éléments donnant des flammes colorées, sont facilement dosés en émission (tabl. 13.1).

■ Tous les atomes excités N_e ne retournent pas à l'état initial en émettant des photons. Ils peuvent perdre leur excédent d'énergie autrement. D'autre part, plus la température croît, plus le spectre d'émission devient complexe par suite de l'apparition de raies dues aux

atomes ionisés (fig. 13.3). Pour étudier ces spectres complexes il faut des instruments possédant une optique de très grande qualité. Ce sont les spectrophotomètres d'émission atomique (cf. chapitre 14).

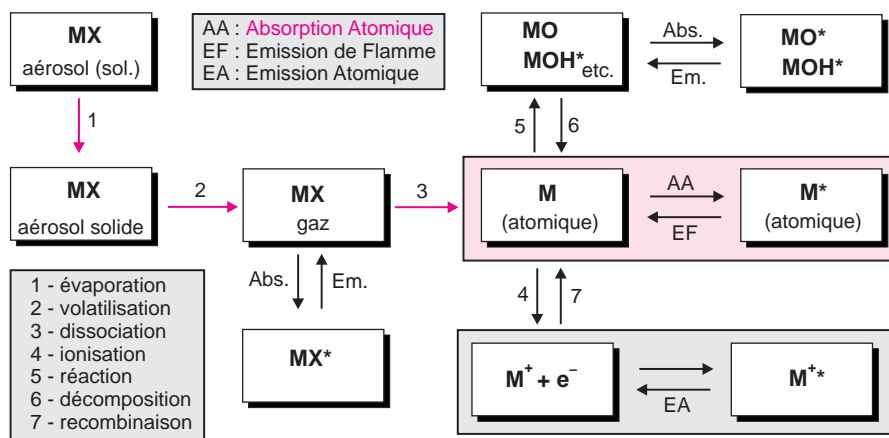


Figure 13.3 Résumé de l'évolution possible d'un aérosol dans une flamme. Absorption et émission atomiques se situent dans la partie du dessin en grisé.

13.4 DOSAGES PAR SAA OU PAR EF

Le dosage des éléments par ces méthodes implique que l'on puisse relier leur concentration à l'intensité de l'absorption ou de l'émission lumineuse correspondante. Les méthodes font appel aux protocoles classiques avec établissement d'une courbe d'étalonnage à partir de solutions synthétiques de concentration croissante en analyte.

13.4.1 Dosages par absorption atomique

L'absorbance de l'élément dans la flamme dépend du nombre d'atomes N_0 restés à l'état fondamental sur le trajet optique. On procède par des mesures comparatives avec des solutions d'étalonnage.

$$A = k \cdot c \quad (13.3)$$

A , absorbance ; c , concentration de l'élément ; k , coefficient propre à chaque élément pour la longueur d'onde choisie.

La comparaison s'arrête là avec la relation de Beer et Lambert (on ne calcule pas le coefficient d'absorption ϵ). L'appareil affiche l'absorbance en faisant le rapport des intensités transmises en l'absence, puis en présence de l'échantillon. La linéarité n'est effective que pour les concentrations faibles (typiquement en dessous de 3 ppm), pour les milieux où l'effet de matrice est négligeable (fig. 13.4). Si la matrice est complexe, il faudra reconstituer, pour la gamme étalon, l'essentiel du milieu ou alors utiliser la méthode des ajouts dosés, en s'assurant, pour cette dernière, de la linéarité de réponse en absorbance.

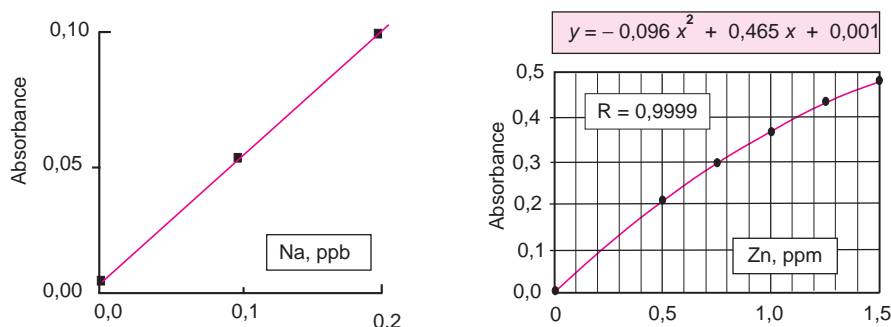


Figure 13.4 Exemples de courbes d'étalonnage en absorption atomique.

Droite d'étalonnage avec un appareil à effet Zeeman (voir § 13.7.2) pour le dosage du sodium à des concentrations sub ppb et courbe quadratique pour le dosage du zinc à des concentrations de l'ordre du ppm avec un appareil à brûleur. Cette dernière courbe montre que pour les concentrations de l'ordre du ppm la linéarité de l'absorbance n'est plus respectée. Les logiciels d'analyse quantitative en SAA proposent plusieurs types de courbes d'étalonnage.

13.4.2 Dosages par émission de flamme

Pour une population de n atomes excités, l'émission lumineuse I_e dépend du nombre dn d'entre eux qui retournent à l'état fondamental pendant l'intervalle de temps dt : ($dn/dt = k'n$). Comme n est proportionnel à la concentration de l'élément dans la partie chaude de l'appareil, l'intensité lumineuse émise I_e , qui varie comme dn/dt , est elle-même proportionnelle à la concentration :

$$I_e = K \cdot c \quad (13.4)$$

Cette formule n'est valable ici encore que pour les faibles concentrations et en l'absence d'autoabsorption ou d'ionisation. Comme précédemment la mise au point d'un dosage par émission de flamme exige un étalonnage de l'appareil avec une gamme de standards.

13.5 INSTRUMENTATION DE BASE EN ABSORPTION ATOMIQUE

Le schéma optique d'un appareil d'absorption atomique, illustré ici par un modèle de base de type monofaisceau (fig. 13.5), comporte quatre parties principales.

Le faisceau lumineux issu de la source (1) traverse la flamme (2) dans laquelle l'élément se trouve porté à l'état atomique, avant d'être focalisé sur la fente d'entrée d'un monochromateur (3) qui sélectionne un intervalle très étroit de longueurs d'onde. Le trajet optique se termine sur la fenêtre d'entrée du détecteur (4).

Si l'élément qui correspond à l'intervalle de longueur d'onde sélectionné par la fente d'entrée du système dispersif n'est pas présent dans la flamme, le détecteur reçoit toute l'intensité lumineuse I_0 émise par la source dans cet intervalle spectral. En revanche si l'élément est présent, l'intensité reçue I est moindre (fig. 13.6).

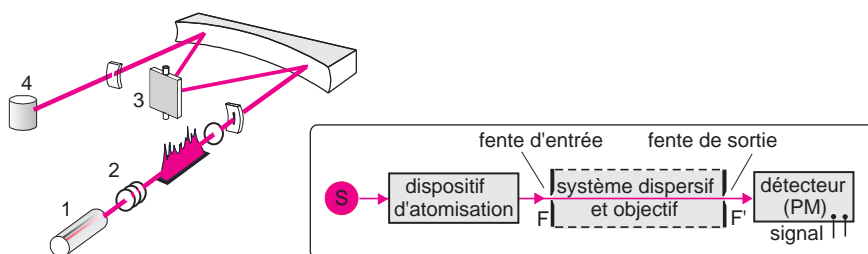


Figure 13.5 Les diverses parties d'un appareil commercial d'absorption atomique monofaisceau.

Modèle IL 157, construit dans les années 80. 1, source (lampe spectrale); 2, flamme du brûleur; 3, monochromateur à réseau et 4, détecteur (photomultiplicateur). La source éclaire une fente située à l'entrée amont du système dispersif. La fente de sortie, en aval, est à proximité de la fenêtre du détecteur. Elle permet de sélectionner une étroite bande passante du spectre ($\Delta\lambda$ de 0,2 à 1 nm), qu'il ne faut confondre ni avec la largeur de cette fente de sortie, ou encore avec celle de l'image de la fente d'entrée.

Si la source émet un *continuum* de lumière, le rapport I/I_0 sera toujours proche de 1 car les raies d'absorption sont très fines (1×10^{-3} nm). Sa valeur sera donc difficile à déterminer avec précision. Si, au contraire, on choisit une source qui émet les seules radiations que l'élément est capable d'absorber, le rapport I/I_0 pourra être beaucoup plus petit que 1. Il en résultera une mesure plus fiable de ce rapport sachant que les photomultiplicateurs actuels sont extrêmement sensibles.

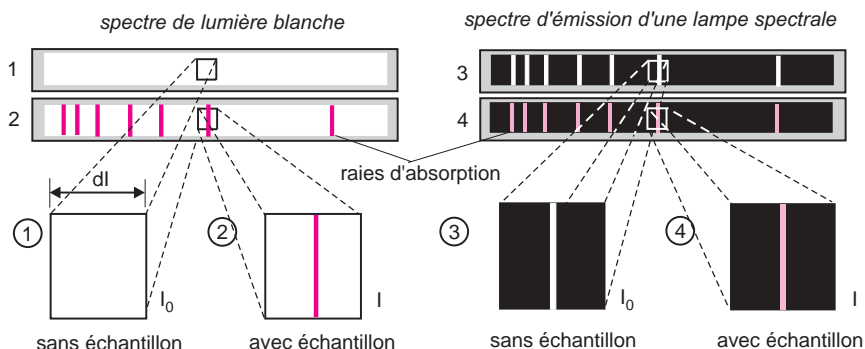


Figure 13.6 Comparaison des intensités transmises en AA avec une source à continuum (1 et 2), et avec une lampe à raies spectrales (3 et 4). Le rectangle figure l'intervalle de longueurs d'onde que « voit » le PM. Le signal de ce dernier est proportionnel à la surface des parties en blanc. Par cette astuce, « la résolution est dans la source », pour reprendre l'expression de Walsh, l'un des pionniers de l'absorption atomique actuelle.

13.5.1 Lampes à cathode creuse

Pour les raisons évoquées ci-dessus, les appareils d'absorption atomique utilisent des lampes à décharge en présence d'argon ou de néon utilisés comme gaz de remplissage sous une pression de quelques centaines de pascals. Le spectre d'émission de ces sources comporte des raies intenses qui dépendent de l'élément constituant la cathode. Ainsi, pour un élément tel le plomb, la cathode devra contenir du plomb. C'est pourquoi il existe près d'une centaine de lampes différentes avec des *cathodes creuses* constituées d'éléments

purs mais aussi d'alliages ou de poudres frittées pour les lampes multiéléments (fig. 13.7). L'anode est en zirconium ou en tungstène et la fenêtre de la lampe est en verre pyrex ou de silice, suivant les longueurs d'onde émises par la cathode. Le montage ci-dessous n'étant pas réalisable pour le sodium (point de fusion trop bas) ou le mercure (état liquide), on utilise des lampes à vapeur métallique.

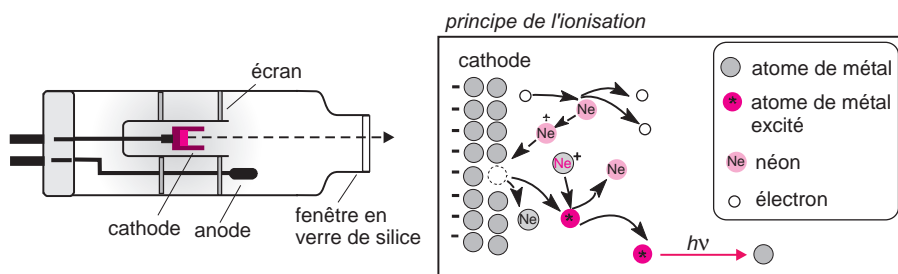
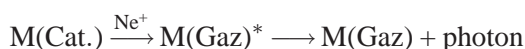


Figure 13.7 Lampe à cathode creuse d'un modèle classique.

La cathode est un cylindre creux dont l'axe de révolution correspond à l'axe optique de la lampe. L'intensité est de quelques milliampères. À droite, dans l'encadré, représentation imagée de l'excitation des atomes de la cathode sous l'impact des ions néon.

Lorsqu'on applique une tension d'environ 300 V entre les électrodes, les électrons provoquent l'ionisation du gaz de remplissage. Ces ions (Ar^+ ou Ne^+), acquièrent assez d'énergie cinétique pour arracher des atomes de la cathode qui devient équivalente, en surface, à un gaz atomique. En appelant $M(\text{Cat.})$ l'élément M à l'état de métal (cathode) et $M(\text{Gaz})$ lorsqu'il est à l'état atomique, l'émission correspond à un enchaînement d'étapes telles que :



Le spectre de la lampe correspond à la superposition des radiations émises par la cathode et par le gaz de remplissage. La largeur des raies d'émission, qui dépend des effets Doppler, Stark (ionisation) et Lorentz (pression), est plus étroite que la largeur de la bande d'absorption correspondante. Le monochromateur permet d'éliminer une grande partie de la lumière parasite due au gaz de remplissage et de choisir la raie la plus intense du spectre, pour avoir une meilleure sensibilité (fig. 13.8), sauf en cas d'interférence avec un autre élément. Enfin, il existe quelques lampes sans électrodes, dont l'émission est très intense. Elles consistent en un tube scellé en silice contenant un sel de l'élément choisi que l'on excite avec un émetteur de radiofréquence. Elles sont réservées, entre autres, à des éléments tels As, Hg, Sb Bi et P.

■ En général pour chaque lampe à CC plusieurs raies d'émission sont utilisables. Elles n'ont pas toutes la même intensité. Le choix de la raie pour un dosage dépend entre autre de la concentration de la solution nébulisée, sachant qu'en SAA la précision du dosage diminue assez vite avec la concentration (plage dynamique de 1 à 100).

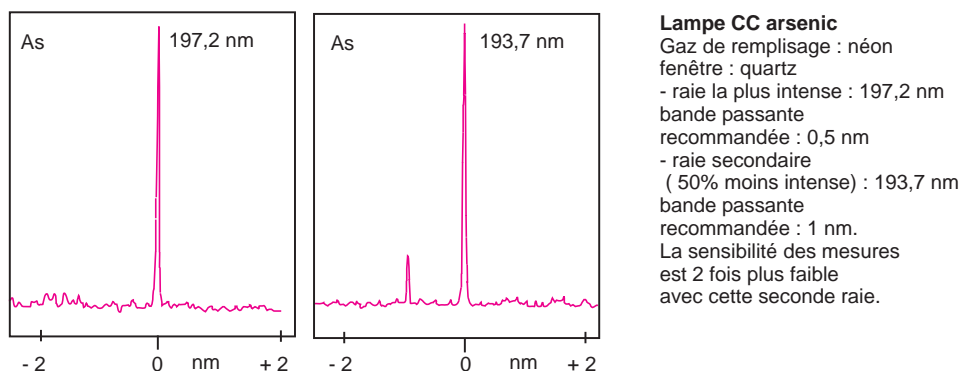


Figure 13.8 Caractéristiques d'une lampe à cathode creuse (CC) pour l'élément As. Il existe une centaine de lampes mono- ou multi-éléments (de 2 à 7 éléments). Leur durée de vie est assez courte.

13.5.2 Dispositifs thermiques pour obtenir des gaz atomiques

- **Atomisation par nébulisation dans une flamme.** Un ensemble mécanique robuste, appelé brûleur, alimenté par un mélange gazeux combustible/comburant, produit une flamme dont la base s'inscrit dans un rectangle de 10 cm de longueur et de 1 mm de largeur. L'axe optique de l'appareil est aligné dans sa plus grande dimension avec la flamme (fig. 13.9). L'échantillon mis en solution aqueuse est aspiré et nébulisé dans ce mélange gazeux.

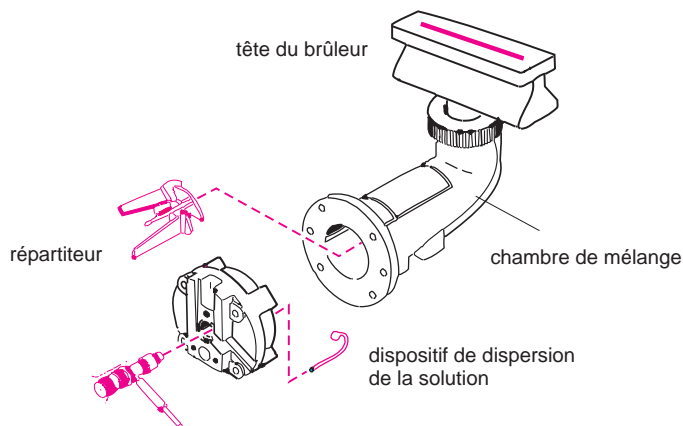


Figure 13.9 Brûleur d'un appareil d'absorption atomique. Modèles 3 100-3 300 de Perkin-Elmer (reproduit avec l'autorisation de cette société).

La flamme est principalement caractérisée par sa réactivité chimique, sa température (tab. 13.2) et son spectre. C'est un milieu complexe en équilibre, comportant des radicaux libres, à l'origine d'un spectre du proche UV, qui résulte de la superposition de raies d'émission et d'absorption, ce qui peut gêner l'observation de certains éléments. N'importe quel type de flamme ne convient donc pas à n'importe quel élément. La réactivité chimique de la flamme n'étant pas homogène il importe de régler la position du trajet optique de l'appareil.

On choisit souvent la flamme air/acétylène. Pour atteindre des températures plus élevées, l'air est remplacé par l'oxyde nitreux N_2O .

Tableau 13.2 Températures limites de quelques mélanges combustibles.

Mélange combustible/comburant	Température max. (K)
butane/air	2 200
acétylène/air	2 600
acétylène/oxyde nitreux (N_2O)	3 000
acétylène/oxygène	3 400

► **Atomisation électrothermique.** Le dispositif précédent avec flamme et nébuliseur est remplacé par un *four graphite* composé d'un tube en carbone graphite comportant une petite nacelle destinée à recevoir une quantité d'échantillon de quelques mg ou μL connue avec précision (fig. 13.10). Ce tube, dont l'axe central se superpose à l'axe optique du spectrophotomètre, fait office de résistance électrique. Il est susceptible d'atteindre, par effet Joule, plus de 3 000 K. Le cycle de chauffage comporte généralement plusieurs étapes. Pour éviter toute perte par projections, on fait croître graduellement la température, pour sécher puis décomposer et enfin atomiser l'échantillon. Dans cette dernière étape, la montée en température peut atteindre 2 000 °C/s grâce à quoi l'échantillon est porté en 3 ou 4 secondes à l'état de gaz atomique.

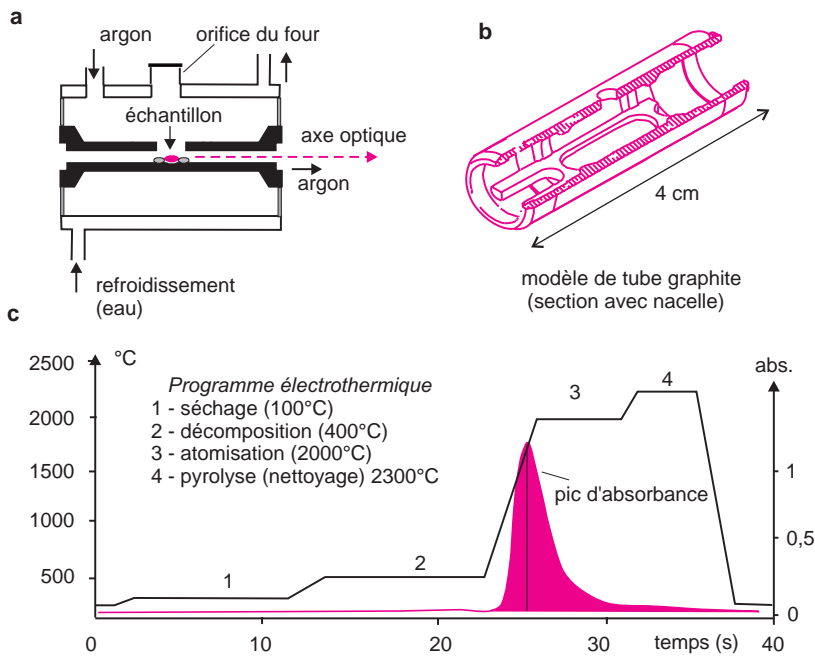


Figure 13.10 Système d'atomisation électrothermique.

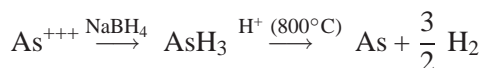
a) Dispositif à four graphite chauffé par effet Joule; b) exemple de tube chauffant en graphite; c) courbe de programmation de température en fonction du temps avec aspect du signal d'absorption. Les deux premières étapes de ce programme électrothermique sont effectuées sous atmosphère inerte (balayage d'argon).

Le tube graphite est entouré d'une double gaine. L'une sert à faire circuler un gaz inerte tel l'argon pour protéger les éléments de l'oxydation, et l'autre de l'eau pour refroidir l'ensemble.

Comparativement au brûleur, ce dispositif produit une plus forte densité d'atomes et un temps de confinement plus long, ce qui peut multiplier la sensibilité par un facteur 1 000.

► **Vaporisation chimique.** Quelques éléments dont l'arsenic (As), le bismuth (Bi), l'étain (Sn), le sélénium (Se) sont difficilement réduits à l'état atomique quand ils sont dans des états d'oxydation élevés. Pour doser ces éléments, on fait réagir l'échantillon, en amont du spectrophotomètre, sur un agent réducteur constitué par du borohydrure de sodium (NaBH_4) ou du chlorure stanneux SnCl_2 en milieu acide (fig. 13.11). Il se forme un hydruure volatil de l'élément qui est entraîné par un gaz de balayage vers une cellule en quartz placée dans la flamme du brûleur.

Exemple de la réduction d'un sel d'arsenic par le borohydrure de sodium :



Les hydruures, facilement thermolysés vers 1 000 K, libèrent l'élément à l'état d'atomes. On utilise de préférence une source lumineuse constituée par une lampe sans électrodes.

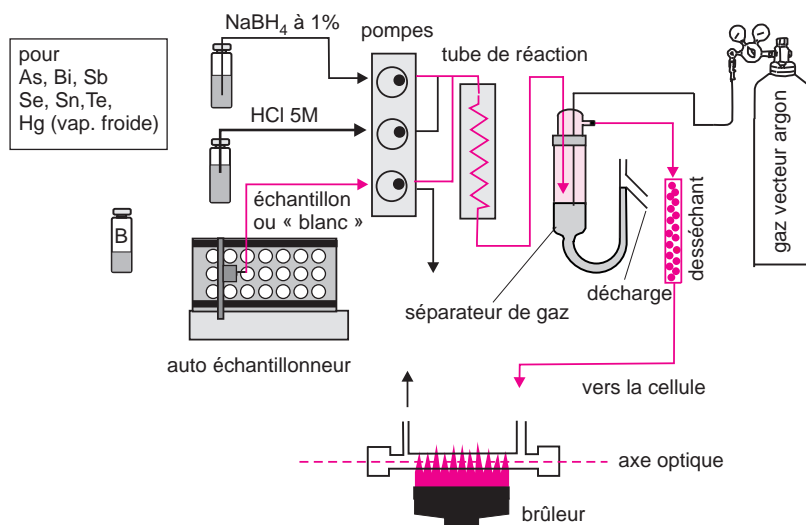


Figure 13.11 Dispositif hydruure

Réservé à certains éléments, cet automate comporte un tube de mélange où l'hydruure du métal (ou du non-métal) est formé par action de l'hydruure de bore. Un courant d'argon extrait l'hydruure métallique formé (séparateur de gaz) pour l'entraîner dans un tube de silice porté entre 800 et 1 000 degrés dans la flamme.

■ Quant au mercure, il n'est pas transformé en hydruure, mais il reste à l'état métallique (Hg^0) on utilise par conséquent une cellule spéciale qui n'a pas besoin d'être portée dans une flamme. C'est la méthode « à vapeur froide » mise en application dans des appareils spécialisés (réduction par SnCl_2).

13.6 PHOTOMÈTRES DE FLAMME

Les mesures par photométrie de flamme sont effectuées, soit à partir des spectromètres d'absorption atomique à brûleur utilisés source éteinte, soit à partir de photomètres de flamme, appareils plus simples, dont le prix d'achat est environ dix fois inférieur à celui des appareils d'absorption atomique. Ces photomètres sont capables de faire des mesures sur cinq ou six éléments seulement. Pour isoler une bande spectrale recouvrant la raie d'émission choisie, ils comportent, à défaut d'un monochromateur, un simple filtre coloré interchangeable. Ils demeurent toujours très utilisés pour les applications de contrôle concernant le dosage des métaux alcalins ou alcalino-terreux (ex. calcium dans les bières ou le lait, potassium dans les ciments et les minerais ...). Certains modèles plus perfectionnés disposent de deux cellules de mesure ce qui permet de comparer l'intensité lumineuse émise avec celle d'une solution de référence, facilitant de ce fait le calcul des concentrations. La limite de linéarité de la réponse est vite atteinte, ce qui impose de travailler avec des solutions faiblement concentrées (10 à 100 ppm).

■ Le principe de la photométrie de flamme est mis à profit dans un type de détecteur spécifique et très sensible de l'élément soufre, en aval d'un chromatographe en phase gazeuse ou dans des analyseurs particuliers. Ainsi, en CPG, quand un composé organo-sulfuré est pyrolysé dans le brûleur du détecteur il se forme au contact d'une flamme air/dihydrogène, réductrice, du soufre à l'état d'élément, qui émet des radiations spécifiques de 394 nm de longueur d'onde.

13.7 CORRECTION DES ABSORPTIONS PARASITES

L'absorption atomique permet de doser environ 70 éléments à des concentrations très faibles (fig. 13.17). Son champ d'application est donc considérable et son utilité est d'autant plus grande que cette méthode accepte des échantillons se présentant sous des formes variées. Comme en spectrophotométrie du visible ou de l'infrarouge, il est nécessaire de faire une correction du fond d'absorption, à la fois pour neutraliser les fluctuations d'intensité de la lampe et retrancher les absorptions parasites.

Avec les appareils à brûleur le bruit de fond est en général peu important parce qu'on nébulise des solutions aqueuses diluées.

En revanche, avec les dispositifs à four graphite, les échantillons déposés à l'état brut, solide ou liquide, peuvent engendrer une absorption parasite résultant d'une atomisation incomplète due à la matrice. C'est le cas notamment des échantillons contenant des particules en suspension, des ions difficilement réductibles ou des molécules organiques non brûlées par manque de dioxygène. Il apparaît un fond absorbant constant (fumées) dans l'intervalle délimité par le monochromateur. Pour corriger cet effet, les constructeurs proposent des appareils modifiés afin d'utiliser diverses méthodes. Étant donné que pour ce type d'échantillon il n'est pas possible de disposer de la matrice seule, sans l'analyte, il ne servirait à rien de fabriquer des appareils comportant un second dispositif thermique en tout point semblable au premier et placé sur un second trajet optique servant de référence.

13.7.1 Correction du bruit de fond par lampe au deutérium

Les modèles utilisant ce mode de correction comportent une seconde source, continue, constituée par une lampe à deutérium (fig. 13.13). Les mesures reposent sur l'emploi d'un miroir tournant. On commence d'abord par régler le monochromateur sur la raie choisie pour le dosage de l'élément à évaluer. Quand la lampe à deutérium est sélectionnée, sachant que l'échantillon est nébulisé dans la flamme, on évalue pratiquement le seul fond d'absorption car la bande passante est une centaine de fois plus large que la raie d'absorption choisie. Quand la lampe à cathode creuse est sélectionnée, on mesure cette fois l'absorbance totale (fond d'absorption et absorption de l'analyte. Les absorbances étant additives, la différence entre les deux mesures permet de connaître l'absorption due au seul élément.

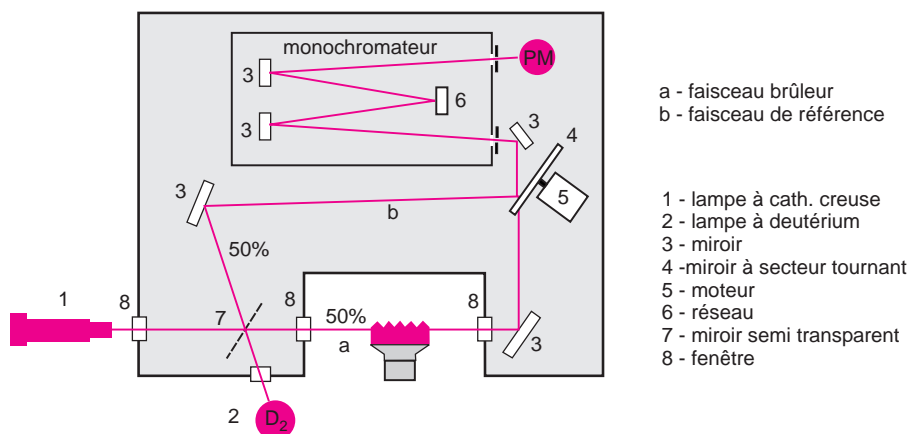


Figure 13.12 Schéma d'un appareil mettant en jeu la correction par lampe au deutérium.

Le montage optique est du type pseudo-double faisceau ce qui permet de s'affranchir de la dérive de la lampe pendant la période où elle n'est pas encore stabilisée. Le trajet optique de la lampe à deutérium se superpose par l'effet d'un miroir semi-transparent, à celui en provenance de la source à CC. La lumière qui arrive sur le détecteur provient en alternance soit de la voie de référence (b) soit de la voie échantillon (a). L'appareil mesure le rapport des intensités transmises par les deux faisceaux. Le domaine de correction est limité à la gamme spectrale de la lampe au deutérium, soit 200-350 nm (d'après le schéma optique du modèle SpectraAA-10/20 de la société Varian)

13.7.2 Correction par application de l'effet Zeeman

L'action d'un champ magnétique B sur un atome provoque une perturbation des états d'énergie de ses électrons. Ce phénomène, appelé effet Zeeman, modifie l'aspect du spectre d'émission (ou d'absorption) de l'élément correspondant, du moins si la valeur du champ atteint au minimum 1 tesla. Tous les éléments ne se comportent pas de la même manière. Dans le cas le plus simple, on observe que la raie d'absorption observée sans champ, conduit à trois nouvelles raies polarisées, dont l'une, appelée composante π , conserve la position initiale tandis que les deux autres, appelées composantes satellites σ , sont décalées symétriquement de part et d'autre de la composante π (quelques picomètres pour un champ de 1 tesla). Les directions de polarisation des raies π et σ sont perpendiculaires. En interposant

sur le trajet optique un polariseur orienté convenablement, on pourra effacer ou non la composante π d'absorption due à l'élément alors que contrairement aux atomes de l'élément, les particules et fumées en suspension ne seront pas affectées par cet effet (fig. 13.13).

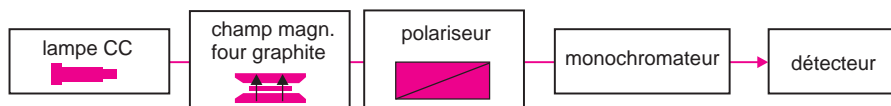


Figure 13.13 Correction par effet Zeeman.

Principe d'un appareil utilisant la correction d'absorbance par effet Zeeman. Deux solutions sont applicables : 1) avec ou sans champ magnétique, et polariseur fixe ; 2) avec champ magnétique fixe et polariseur tournant.

L'application en AA conduit à placer un électroaimant au niveau du four graphite (ou de la flamme) ainsi qu'un polariseur sur le trajet optique. Deux montages coexistent :

- Le montage le plus fréquent consiste à opérer à champ fixe et à placer un polariseur tournant entre la lampe et le four. Le signal oscille entre deux valeurs qui correspondent soit au fond d'absorption seul, quand le polariseur envoie une lumière polarisée perpendiculairement à la direction du champ magnétique soit au fond d'absorption augmentée de l'absorption de la composante π de l'élément quand la direction de polarisation de l'onde est celle du champ (fig. 13.14).

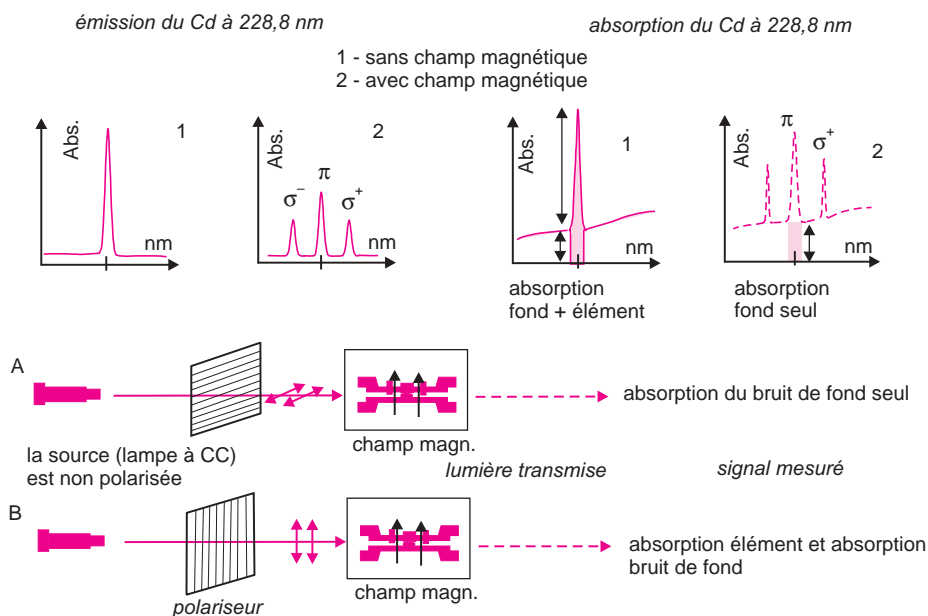


Figure 13.14 Effet Zeeman simple.

Explication imagée de la méthode du champ oscillant à partir de l'élément cadmium. En 1, champ magnétique perpendiculaire au plan de polarisation de la lumière, en 2, champ magnétique parallèle.

- Le second montage, plus ancien, consiste à faire deux mesures comparatives *avec puis sans* champ B . En l'absence du champ B , le détecteur permet de calculer l'absorption totale : fond d'absorption et absorption de l'élément à doser : les deux absorptions s'ajoutent. En revanche lorsqu'on applique le champ B , la bande d'absorption sélectionnée éclate en plusieurs nouvelles raies. Celles qui ont changé de position ne peuvent plus occulter la raie émise par la source. Elles n'interviennent donc plus. Quant à la raie qui subsiste à la longueur d'onde initiale (lorsque $B = 0$), elle est polarisée suivant l'axe du champ. De ce fait, elle n'absorbe les radiations de la source que dans cette direction. Comme on a pris soin d'interposer un polariseur « perpendiculaire » à la direction de B , il ne décèle pas cette absorption : l'élément est devenu transparent. En bref, le détecteur ne perçoit plus que le fond continu d'absorption (fig. 13.14).

13.7.3 Correction du bruit de fond par lampe pulsée (méthode S-H)

Quand on augmente brusquement l'intensité d'une lampe à cathode creuse par diminution de la résistance de ballastage du circuit d'alimentation, l'aspect des raies d'émission change. Leur profil s'élargit, conséquence attendue de l'augmentation de température de la cathode, et il apparaît en leur milieu une partie moins intense. Ce phénomène provient de la cathode dont la température élevée provoque une sorte d'évaporation des atomes la constituant à l'intérieur de la lampe. Ce nuage d'atomes réabsorbe une fraction de la lumière, précisément de même longueur d'onde que celle qui provient de la partie émissive de cette cathode (fig. 13.15).

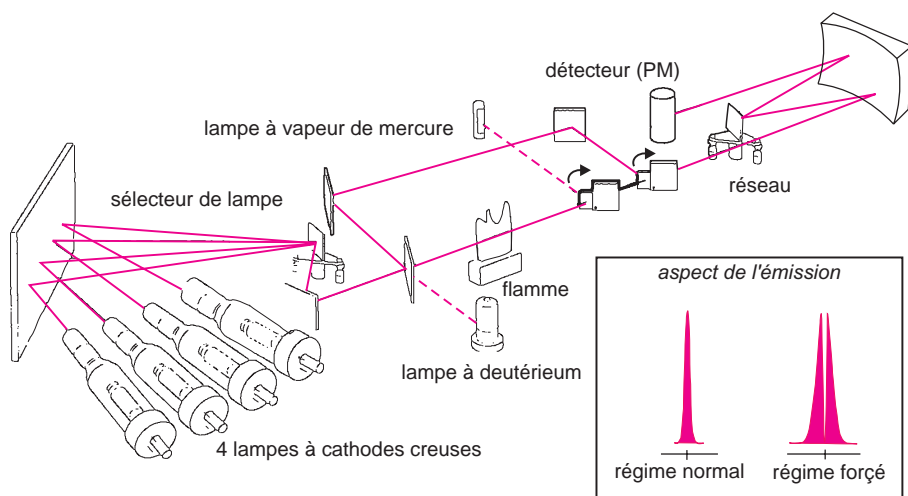


Figure 13.15 Correction par lampe pulsée.

Le modèle 4000 à correction de Smith-Hieftje de la Société Thermo Jarrell Ash utilise le principe de la correction de fond par source pulsée. La source au mercure ainsi que les miroirs rétractables servent à l'étalonnage du monochromateur (reproduit avec l'autorisation de cette société). Aspect d'une raie d'émission d'une lampe à CC selon son alimentation.

Cette autoabsorption est exploitée pour déterminer la part du bruit de fond dans l'absorption totale. Pour obtenir les absorbances corrigées, la méthode connue du nom de Smith-Hieftje, utilise une lampe pulsée qui passe alternativement d'un régime normal (ex. 10 mA) à un régime forcé (500 mA). En régime normal, avec l'échantillon dans la flamme, on mesure globalement la somme du fond d'absorption et de l'absorption de l'élément, alors qu'en régime forcé, on mesure le fond d'absorption, puisque la lampe n'émet pratiquement plus à la longueur d'onde choisie. La différence entre ces deux mesures d'absorbance, faites de manière répétitive, permet donc de calculer l'absorption du seul élément dosé.

■ Ces trois méthodes de correction présentent avantages et inconvénients. La méthode *D2* utilise un montage optique plus complexe avec une seconde source, la méthode Zeeman est coûteuse, la méthode S—H nécessite des lampes spéciales. La gamme dynamique est diminuée. Le choix du dispositif de correction doit être fait en fonction des applications prévues.

13.8 PERTURBATIONS PHYSIQUES ET CHIMIQUES

Pour doser un élément, on choisit, si possible, une raie d'émission intense de la lampe correspondante. La plus intense correspond généralement à la raie de résonance. Cependant divers facteurs apportés par la matrice peuvent conduire à des résultats d'analyses erronés.

13.8.1 Interférences spectrales

Le dispositif à four graphite peut conduire à une émission parasite due aux parois du tube. Les composés de la matrice peuvent conduire également à des absorptions annexes.

On n'est donc jamais à l'abri de la superposition de deux radiations : celle choisie pour le dosage avec une raie secondaire appartenant à un autre élément. En absorption atomique, les confusions sont rares, mais il est quelquefois conseillé d'effectuer une seconde mesure en changeant la longueur d'onde. En émission atomique ce problème est fréquent, les spectres étant plus complexes (chapitre 14).

13.8.2 Superposition de l'émission et de l'absorption d'un même élément

Une fraction non négligeable des atomes de certains éléments passe à l'état excité par effet thermique. Ces atomes émettent précisément des photons de même énergie que les atomes restés à l'état fondamental sont susceptibles d'absorber. Pour corriger la mesure on alimente la lampe avec une tension pulsée, ce qui permet de différencier le signal de l'émission, constant, du signal dû à l'absorption qui lui est pulsé.

13.8.3 Interactions chimiques

Quand on fait appel à l'absorption atomique pour rechercher des éléments à l'état de traces, il est important de tenir compte de la matrice dans laquelle ils sont présents. Il faut suivre des protocoles bien établis pour supprimer les interférences ioniques ou chimiques. À titre correctif, on introduit dans les solutions à doser des sels minéraux ou des réactifs organiques servant d'« agents libérateurs ». Ainsi l'élément M sera libéré de la combinaison

MX d'autant plus facilement par le libérateur R que le composé R–X sera plus stable.



■ Ainsi, lorsqu'on veut doser le calcium en présence d'ions phosphates ou dans des combinaisons réfractaires contenant de l'aluminium, on ajoute du chlorure de strontium ou de lanthane. L'effet recherché est de libérer le calcium et d'augmenter la volatilité de la matrice pour assurer son élimination plus efficacement au cours de l'étape de décomposition. Pour le dosage du sodium ou du potassium il est courant d'ajouter un peu de solution de Schinkel (CsCl/LaCl₃).

Pour les appareils à four graphite, on ajoute de l'acide éthylènediaminetétracétique (EDTA) qui forme des complexes 1:1 avec les ions bivalents, ou du nitrate d'ammonium lorsqu'on est en présence d'une matrice contenant beaucoup de sodium (fig. 13.16).

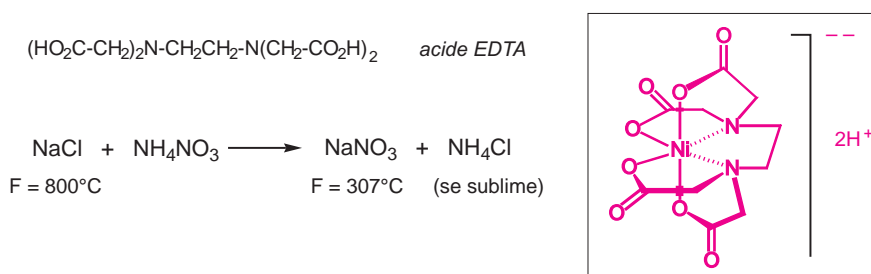


Figure 13.16 Modification de matrice.

Le nitrate d'ammonium ou l'acide EDTA augmentent la volatilité de certains éléments. Complexe volatil de type 1:1 entre une molécule d'EDTA et un ion Ni⁺⁺.

Enfin, l'utilisation de flammes très chaudes peut provoquer l'ionisation partielle de certains éléments, diminuant d'autant la concentration en atomes libres dans la flamme. On corrige ce phénomène en ajoutant un suppresseur d'ionisation sous forme d'un cation dont le potentiel d'ionisation est plus faible que celui de l'analyte, Un sel de potassium à 2 g/L convient.

■ Cette variation de l'ionisation peut se faire plus ou moins spontanément quand la matrice contient, par nature, un ou plusieurs éléments alcalins. Pour éviter de telles erreurs aléatoires, on ajoute donc systématiquement aux solutions, un tampon d'ionisation à base de sel de potassium ou de sodium, ou bien on constitue une gamme d'étalonnage avec un milieu proche de celui dans lequel se trouve l'analyte.

13.9 SENSIBILITÉ ET LIMITE DE DÉTECTION EN SAA

La concentration la plus basse pouvant être quantifiée dans un échantillon dépend de beaucoup de facteurs. En spectrométrie la *sensibilité* est définie à partir d'un élément, comme étant la concentration exprimée en µg/mL qui, en solution aqueuse, conduit à une diminution de la lumière transmise de 1 % ($A = 0,0044$). Quand on le peut, on établit les courbes d'étalonnages avec des concentrations de l'ordre de 20 à 200 fois cette limite.

La *limite de détection* correspond à la concentration de l'élément qui donne un signal dont l'intensité est définie sur la base de trois fois l'écart-type d'une série de mesures faites pour

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 13.1

En admettant que la réponse du détecteur d'un photomètre de flamme soit proportionnelle à la concentration de l'élément passé à l'état excité par effet de la température, par quel facteur est multiplié le signal lorsque la température passe de 2 000 à 2 500 K ?

On établira l'expression littérale, puis on l'appliquera au cas de l'élément sodium, dont la raie de résonance est à 589 nm.

Exercice 13.2

On analyse le potassium d'un sérum sanguin par émission de flamme en utilisant une méthode d'ajout. À cette fin, on prépare deux solutions identiques : on prélève 0,5 mL de sérum et on complète à 5 mL avec de l'eau distillée. Dans l'une d'elles on ajoute 10 μL de KCl 0,2 M. Les valeurs lues sur l'appareil sont respectivement 32,1 et 58,6.

Quelle est la concentration en potassium du sérum ?

Exercice 13.3

Pourquoi ajoute-t-on souvent un sel de potassium tel que KCl lorsqu'on veut doser l'élément sodium par spectrophotométrie d'émission de flamme ? On rappelle que le potentiel de première ionisation du sodium et du potassium sont respectivement égaux à 496 et 419 $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Exercice 13.4

Pour doser la quantité de plomb présent dans un échantillon de paprika frelaté par adjonction d'oxyde de plomb (même couleur), on utilise la méthode avec four graphite associé à un dispositif à effet Zeeman.

On dépose 0,01 g de poudre de paprika frelaté dans la coupelle d'un four graphite, ce qui permet de déterminer l'aire du pic d'absorbance. La mesure est effectuée à $\lambda = 283,3 \text{ nm}$ en l'absence puis en présence de champ magnétique. On trouve une valeur corrigée après correction du fond d'absorption de 1 220 (unités arbitraires). Dans les mêmes conditions de mesure, 0,01 mL d'une solution à $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ en élément plomb conduit à la valeur de 1 000 (mêmes unités).

Calculer le pourcentage massique de plomb dans l'échantillon de paprika considéré.

Exercice 13.5

Parmi les nombreux dérivés commerciaux utilisés en complexométrie de l'acide éthylène-diamine tétraacétique (EDTA) on trouve le sel mixte de Zn/Na contenant 1 atome de zinc et 2 atomes de sodium par molécule d'EDTA. Ce sel mixte se présente sous forme d'un hydrate cristallisé. On veut calculer le nombre de molécules d'eau de cet hydrate en dosant le zinc par AA.

La solution échantillon est préparée en dissolvant 35,7 mg de cet hydrate dans 100 mL d'eau. On prélève 2 mL de cette solution que l'on complète à 100 mL avec de l'eau.

L'étalonnage est réalisé à partir de 5 solutions étalons de zinc ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$).

Solutions	Concentration	Absorbance
blanc	0,00 mg/L	0,0006
standard 1	0,50 mg/L	0,2094
standard 2	0,75 mg /L	0,2961
standard 3	1,00 mg /L	0,3674
standard 4	1,25 mg /L	0,4333
standard 5	1,50 mg/L	0,4817
Échantillon	C ?	0,3692

a) La *largeur de fente* de l'appareil d'absorption atomique utilisé a la valeur de 1 nm. Que représente ce paramètre ?

b) L'appareil propose une courbe d'étalonnage telle que $C = 0,99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ pour une absorbance de 0,3692. Calculer le nombre de molécules d'eau du sel Zn/Na.

c) En utilisant la méthode de régression linéaire pour trouver l'équation de la droite d'étalonnage, quelle valeur de la concentration C ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) trouve-t-on ?

Données : H = 1,01 ; C = 12,0 ; N = 14,01 ; O = 16,00 ; Na = 22,99 ; Zn = 65,39 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Chapitre 14

Spectrométrie d'émission atomique

L'analyse par spectrométrie d'émission atomique constitue une méthode générale de dosage des éléments qui repose sur l'étude optique des radiations émises par les atomes passés dans un état excité, généralement ionisé. Plusieurs procédés sont utilisés pour dissocier les échantillons en leurs éléments constitutifs, notamment par l'effet de températures très élevées générées par des plasmas. Les spectres étant beaucoup plus complexes qu'en émission de flamme, il faut des instruments dont l'optique est de très grande qualité pour résoudre les situations d'interférences de raies et les effets de matrice.

Le domaine analytique de cette technique très sensible (quelques ppb) recouvre une gamme dynamique étendue. Utilisée depuis ses débuts dans les laboratoires métallurgiques, elle est devenue un outil indispensable de l'analyse chimique. Elle est arrivée à un point d'automatisation où du personnel peu expérimenté peut l'utiliser. Les spectromètres sont capables d'analyser en routine plusieurs éléments simultanément ou de façon séquentielle. Elle co-existe avec l'absorption atomique comparativement à laquelle elle est plus complémentaire que concurrente. Elle est enfin moins coûteuse que la spectrométrie de masse appliquée aux éléments mais ne convient pas aux analyses des éléments légers.

14.1 SPECTROMÉTRIE D'ÉMISSION OPTIQUE DES ATOMES (OES)

Quand on soumet un élément chimique, pris à l'état atomique, à des conditions d'excitation convenables, il émet des radiations qui lui sont caractéristiques. Sur cette observation repose une forme d'analyse élémentaire qualitative et quantitative très générale. Connue également sous le sigle OES (*Optical Emission Spectroscopy*), l'émission optique des atomes est très complexe. Elle conduit à des milliers de radiations accompagnées d'un fond continu.

Les appareils correspondants se composent de plusieurs parties : le dispositif chargé de porter la prise d'essai sous la forme d'atomes ionisés et excités à haute température (résultant de l'usage de plasmas de gaz, d'étincelles ou de lasers), le banc optique, de grande qualité, qui conditionne les performances analytiques finales, la partie détection et enfin la partie informatique, interface graphique, logicielle indispensables à tout l'ensemble.

Ce qui distingue, en premier lieu, ces spectromètres des appareils d'absorption atomique ou d'émission de flamme, est leur taille plus imposante. Leur prix d'achat élevé représente un gros investissement pour les laboratoires d'analyse qui, pour en amortir le coût, doivent avoir beaucoup d'échantillons à traiter.

14.2 PRINCIPE DE L'ANALYSE PAR ÉMISSION ATOMIQUE

Un spectromètre d'émission atomique comporte (fig. 14.1) :

- un dispositif pour introduire et dissocier l'échantillon à l'état d'atomes ou d'ions ;
- un système optique pour séparer les différentes émissions optiques ;
- un système de détection et d'analyse du rayonnement émis ;
- un système informatique pour réaliser l'interface avec l'utilisateur.

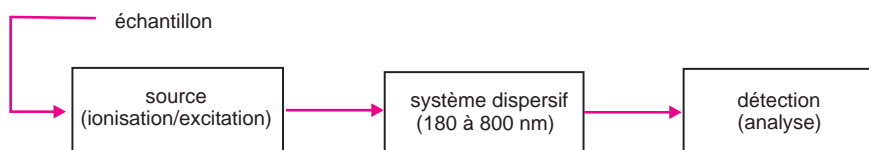


Figure 14.1 Conception de base d'un spectromètre d'émission atomique.

Comme en émission de flamme, la source lumineuse du spectromètre n'est autre que l'échantillon dont tous les atomes sont excités simultanément. On peut donc faire une analyse de composition, du moins qualitative, même si l'échantillon est inconnu au départ. Cela marque une différence importante avec l'absorption atomique qui ne peut doser que les éléments pour lesquels l'appareil a été préparé (par le choix, *a priori*, de la lampe à cathode creuse). Avec une seule prise d'essai, on obtient en quelques minutes une analyse multi-élémentaire, contrairement à l'absorption atomique. Cependant on ne peut véritablement doser que les éléments pour lesquels l'étalonnage a été soigneusement réalisé.

Chaque atome, après avoir été porté dans un état excité, peut perdre son excédent d'énergie par émission d'un ou plusieurs photons dont les énergies peuvent prendre des centaines de valeurs distinctes (fig. 14.2). Le système dispersif fait donc apparaître une multitude de radiations de longueurs d'ondes et d'intensités différentes. Sachant que pour un échantillon la matrice (ensemble des autres éléments présents et solution) est également émissive, l'identification d'un élément, qui peut être présent à l'état d'ultratraces, de même que son dosage reposent sur des mesures faites à plusieurs longueurs d'onde (une sorte d'empreinte).

L'analyse par émission atomique exige donc un matériel très performant capable de repérer des radiations faibles situées à proximité d'autres qui sont beaucoup plus intenses. C'est pourquoi, quand on peut choisir, on donne la préférence aux appareils dont la *gamme dynamique* exploitable est grande.

- Les appareils de photométrie de flamme, utilisables pour doser quelques éléments seulement, sont de conception beaucoup plus simple. Lorsqu'on recherche le sodium par exemple, avec un instrument dont la flamme atteint 2 000 °C, les atomes de cet élément sont pratiquement les seuls à émettre des radiations. Pour mesurer la lumière émise, il suffit d'interposer entre la flamme et le détecteur, à défaut d'un monochromateur, un simple filtre optique pour isoler une bande spectrale assez large convenant aux radiations émises par l'élément.

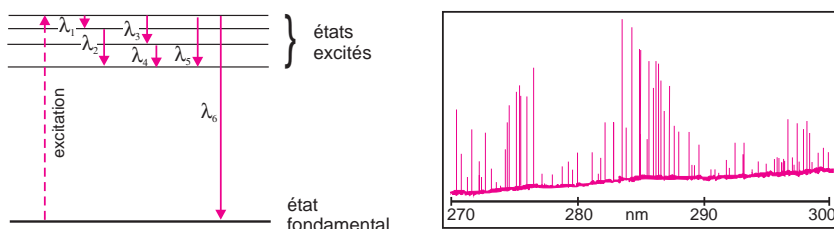


Figure 14.2 Transitions énergétiques pendant l'émission atomique.

Pour chaque atome il existe des centaines de possibilités de retour à l'état fondamental, chacune ayant une probabilité de se produire, si bien que pour le plus petit échantillon, qui comporte déjà un nombre énorme de ces atomes, on observe un spectre d'émission riche de centaines de transitions. À droite, exemple d'un spectre partiel d'une solution aqueuse contenant quelques ppm d'un sel de chrome.

14.3 PROCÉDÉS POUR DISSOCIER L'ÉCHANTILLON EN ATOMES OU IONS

Pour transformer l'échantillon à l'état d'atomes ou d'ions excités, on fait appel à des procédés basés sur les plasmas de gaz, les étincelles, les lasers ou les décharges lumineuses.

14.3.1 Excitation au moyen de plasmas de gaz

La plupart des appareils d'émission atomique comportent une *torche à plasma* (torche ICP) car ce dispositif est bien adapté aux échantillons en solution aqueuse. Il s'agit de *plasmas à couplage inductif* obtenus avec l'aide d'une tension haute fréquence. Une variante consiste à utiliser un générateur de micro-ondes.

- Un plasma est un milieu particulier, considéré comme le quatrième état de la matière, constitué d'atomes isolés à l'état d'équilibre entre leur forme neutre et leur forme ionisée (1 à 2 %) et d'électrons ($10^{18}/\text{cm}^3$) qui assurent globalement la neutralité de ce milieu.

Pour amorcer le plasma, on amène un courant d'argon faiblement ionisé par des étincelles (décharge Tesla) à l'extrémité d'un tube de quartz situé dans l'axe d'un enroulement de quelques spires d'un tuyau de cuivre refroidi par une circulation d'eau (fig. 14.3). Ces spires sont raccordées à un générateur de radiofréquences (typiquement 27 ou 40 MHz) d'une puissance de 1 à 2 kilowatts. Le champ magnétique variable créé confine les ions et les électrons sur un parcours annulaire (apparition d'un courant d'Eddy). Le milieu, qui devient de plus en plus conducteur, s'échauffe considérablement par effet Joule. Il se comporte comme le bobinage secondaire d'un transformateur en court-circuit. Le plasma est maintenu isolé des parois en faisant arriver par un tube extérieur et concentrique au précédent un second flux d'argon, cette fois non ionisé, afin de refroidir le tube central de la torche.

La température du plasma peut dépasser 8 000 K en certains points. Comparativement, les flammes utilisées en photométrie de flamme font figure de sources relativement froides. L'échantillon, mis sous forme d'un aérosol au moyen d'un nébuliseur, est introduit avec un débit constant de quelques mg/min à la base de la torche par un autre tube de petit diamètre (1 à 2 mm). L'endroit choisi pour la « prise de lumière » du plasma, (transversale ou en bout – on dit encore *radiale* ou *axiale*), dépend de l'élément, et selon que le dosage est basé sur l'étude d'une raie ionique ou atomique. La température varie en effet de 9 000 à 2 000 K.

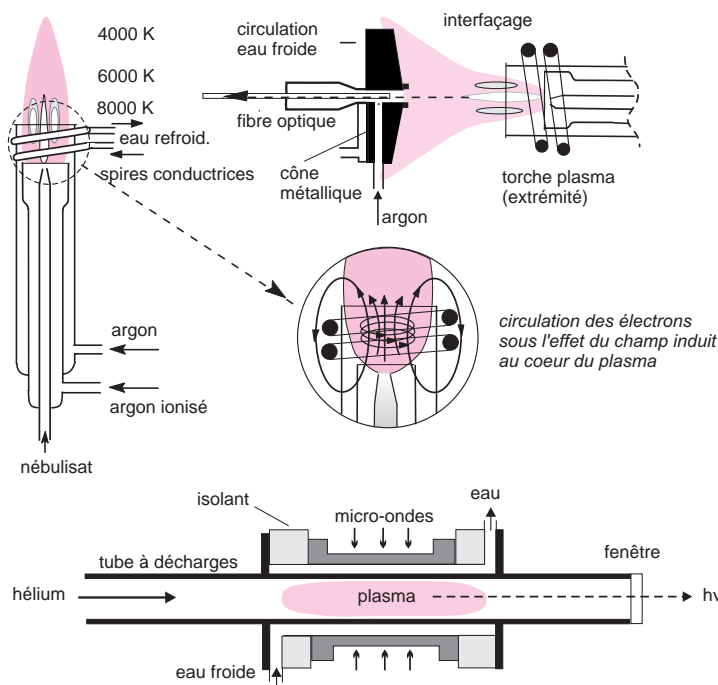


Figure 14.3 Plasmas obtenus par couplage inductif ou par micro-ondes.

a) En haut : à gauche (pour prise de lumière radiale), torche alimentée par un courant de radiofréquences (entre 27 et 50 MHz), à l'origine de la circulation des électrons dans le gaz inerte ; à droite (pour une prise de lumière axiale), dispositif refroidi utilisant une fibre optique. La torche consomme 10 à 15 L/min d'argon, celui-ci servant à la fois de gaz d'ionisation, de gaz de nébulisation et de gaz de refroidissement (une nécessité pour éviter que la torche ne fonde !); b) en bas, plasma à micro-ondes utilisé en sortie d'un chromatographe en phase gazeuse. Ces sources à plasma sont stabilisées pour une meilleure reproductibilité des analyses.

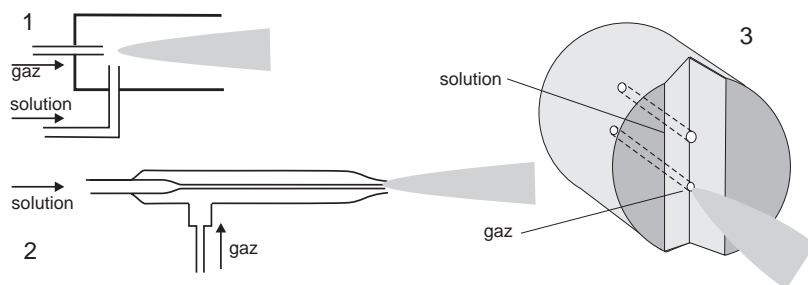


Figure 14.4 Nébuliseurs.

Modèles à flux concentriques (1), croisés (2) et parallèles (3). Contrairement aux deux autres modèles, ce dernier type n'est pas sujet au bouchage par d'éventuelles impuretés solides dans la solution. Celle-ci sort par un gros capillaire et s'écoule par gravité le long de la rainure en forme de V jusqu'à l'embouchure du gaz (argon) qui produit l'aérosol. L'emploi d'une pompe pour la solution régularise le débit de l'aérosol. En aval du dispositif nébuliseur on trouve une chambre de nébulisation comportant un drain, ce qui permet d'éliminer les plus grosses gouttelettes par gravité.

■ La torche ICP produit une double action sur les atomes : elle les excite ce qui leur fait émettre des photons et elle les fait passer à l'état d'ions. C'est pourquoi on retrouve ce dispositif en spectrométrie de masse inorganique à des fins d'analyse élémentaire (cf. § 16.9 & 16.11). Dans les deux cas l'échantillon doit arriver sous forme d'un aérosol de gouttelettes ne dépassant pas quelques microns de diamètre. Pour cela on utilise un nébuliseur comportant deux arrivées, l'une pour l'échantillon en solution l'autre pour un gaz servant à rompre le liquide en fines gouttelettes et donc à générer l'aérosol. Ces deux arrivées peuvent être concentriques, ou perpendiculaires ou parallèles. Le choix dépend du débit nécessaire et de la concentration ionique de la solution (fig 14.4).

14.3.2 Excitation par action des étincelles ou d'un laser

À côté des plasmas qui occupent le devant de la scène des dispositifs d'atomisation et d'excitation thermiques, d'autres procédés sont également utilisés. Ils font soit appel aux arcs ou étincelles électriques pour les échantillons conducteurs (fig. 14.5), soit à un laser impulsionnel qui permet d'engendrer également des étincelles (un plasma également) à la surface du matériau étudié. Ce sont des *méthodes d'ablation* qui ont beaucoup progressé, et qui sont utilisées en analyse industrielle (aciéries, cimenteries). On les retrouve associées aux différents montages optiques des appareils actuels (fig. 14.6).

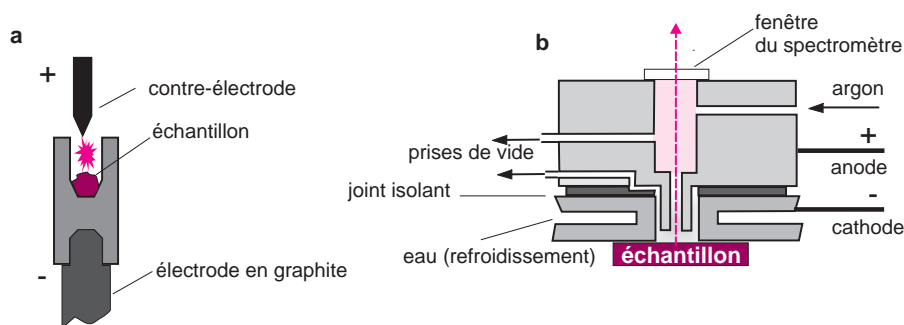


Figure 14.5 Dispositifs d'ionisation.

a) **Arc continu** (technique « globulaire »). Les électrodes sont soumises à une tension continue de quelques dizaines de volts ($I = 10\text{--}20\text{ A}$). L'usage d'électrodes en graphite est à l'origine de raies d'émission dues aux radicaux et aux molécules organiques « primitives » (bandes cyanogène CN entre 320 et 400 nm) ainsi que d'un fond continu. La température se stabilise entre 3 000 et 6 000 K; b) **Dispositif à décharge lumineuse**. L'échantillon (conducteur ou non) vient sceller une enceinte dans laquelle règne une faible pression d'argon. Le plasma est confiné dans l'espace anodique. Il conduit à l'excitation des atomes érodés de la surface de l'échantillon.

■ L'ablation au moyen d'étincelles répétitives permet de produire un aérosol à partir de la surface de l'échantillon. La matière ainsi volatilisée au point d'impact des étincelles (environ 1 mg/min) est alors dirigée par un flux d'argon dans une torche ICP classique opérant sous argon avec une tension atteignant 20 à 50 kV. Par ailleurs, l'émission lumineuse recueillie directement au niveau des étincelles conduit à des spectres de raies ioniques alors qu'avec les arcs continus, on provoque plutôt des raies atomiques neutres.

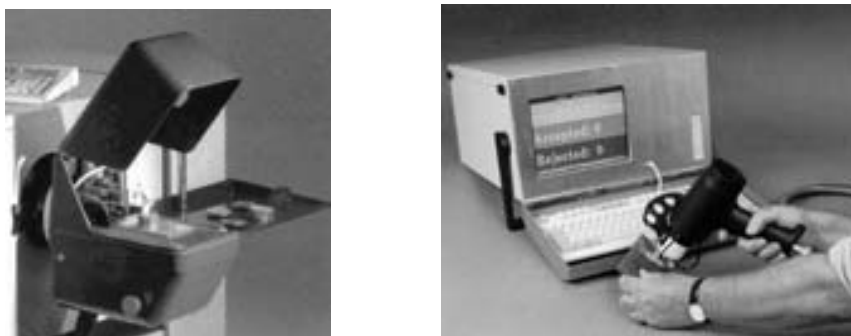


Figure 14.6 Appareils d'émission atomique à ionisation par étincelage.

À gauche modèle JY-50 de Jobin-Yvon. Détail de la chambre d'étincelage en position ouverte. À droite, poste mobile d'analyse industrielle ARC Met-900 de la société Metorex. L'étincelage est produit au moyen du pistolet, relié par fibre optique au spectrophotomètre situé dans la console (reproduit avec l'autorisation des sociétés Jobin-Yvon et American Stress Technologies).

14.3.3 Excitation à l'aide d'une source à décharge lumineuse

Si l'échantillon est sous forme solide et si possible conducteur du courant électrique, On en fait la cathode d'une sorte de lampe spectrale dont le principe de fonctionnement est identique à celui d'une lampe à cathode creuse (cf. § 13.5.1 et fig. 14.5). Les atomes érodés de la surface de l'échantillon sont excités par le plasma. Ce procédé est surtout utilisé pour les analyses de surface. Il a pour avantage de conduire à des spectres dont les raies d'émission sont étroites, l'atomisation se faisant à une température plus basse que dans les autres techniques.

14.3.4 Excitation à l'aide d'une plasma par micro-ondes

Encore peu développé, l'emploi de micro-ondes représente une alternative pour former des plasmas de petite taille, en forme de torche et consommant par conséquent moins d'énergie et de gaz.

14.4 SYSTÈMES DISPERSIFS ET RAIES SPECTRALES

La partie active de l'optique commence par la *fente d'entrée*, réglable en largeur par un système mécanique, sur laquelle est focalisée la lumière produite par l'échantillon (la source lumineuse). Sa largeur ne peut être inférieure à quelques micromètres parce qu'il faut bien qu'un minimum de lumière la traverse, mais sa longueur peut atteindre plusieurs centimètres. La source est ainsi transformée en un *objet lumineux* de forme linéaire, dont l'optique de l'appareil va donner autant d'images, encore plus fines — les raies —, qu'il y aura de radiations de différentes longueurs d'onde, présentes dans la source. Ainsi chaque raie observée correspond à l'image pratiquement monochromatique de la fente d'entrée du spectrographe. Un seul élément peut générer plus de 2 000 raies.

■ Concrètement, les raies se présentent dans le plan focal comme une succession de segments lumineux parallèles et très fins. Ces raies ont une largeur qui résulte de causes indépendantes.

Il s'agit d'abord de causes techniques, propres à l'instrument, réunies sous le terme de « fonction d'appareil » : largeur de la fente d'entrée, qualité de l'optique, dont sa distance focale, phénomènes de diffraction à travers les orifices étroits.

Cependant il existe aussi des causes dues à la mécanique quantique qui font que les transitions spectrales ont une largeur naturelle. Les radiations émises par les atomes ne sont pas tout à fait monochromatiques. En particulier dans les plasmas, milieux dans lesquels les collisions sont très rapprochées (ce qui diminue énormément la durée de vie des états excités), le principe d'incertitude d'Heisenberg joue à plein (fig. 14.7). En outre la température élevée augmente la vitesse des atomes ; c'est l'effet Doppler. La largeur naturelle des raies, vers 6 000 K, atteint plusieurs picomètres.

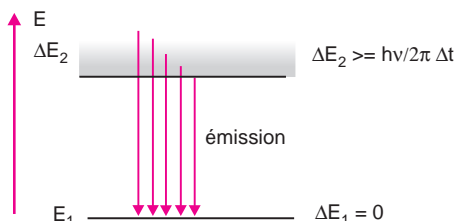


Figure 14.7 Largeur naturelle d'une raie.

Représentation d'une transition entre un niveau fondamental stable, dont la durée de vie est infinie et un niveau excité de très courte durée de vie. L'incertitude ΔE_2 se traduit par une imprécision sur la longueur d'onde correspondante.

Pour repérer les radiations spécifiques de l'élément à quantifier (les différentes transitions optiques) il faut un banc optique de grande qualité. Les montages sont répartis entre *spectrographes* et *spectromètres* (fig. 9.12 et 14.8). La source éclaire une fente qui devient un objet lumineux qui va être analysé par un système dispersif comportant des réseaux (plans ou concaves ou *échelles*).

- Dans un spectrographe, la fente d'entrée donne autant d'images, décalées les unes par rapport aux autres, qu'il y a de radiations différentes dans la source. Avec un détecteur constitué d'un capteur CCD (anciennement une plaque photographique), on obtient un enregistrement simultané.
- Dans un spectromètre, le détecteur est fixe, et ne reçoit donc que la radiation sélectionnée au moyen d'un monochromateur (constitué par la réunion d'un réseau optique et d'un moteur). Ce système ne permet, par conséquent, de mesurer que l'intensité d'une seule raie à la fois. Ces appareils utilisés pour effectuer des dosages, ne permettent pas d'enregistrer un spectre.

Le monochromateur peut être remplacé par un polychromateur, dispositif qui comporte, dans le plan focal image de la fente d'entrée, une plaque percée de plusieurs fenêtres (ou fentes) de sortie dont les positions ont été choisies en fonction des éléments à détecter. Derrière chacune d'elles se trouve un détecteur (fig 14.8) pour recueillir la radiation sélectionnée. L'optique ne comporte pas de pièce en mouvement.

■ À l'origine, l'étude qualitative de ces spectres se faisait à l'aide de spectrographes à observation visuelle, travaillant par comparaison : ils sont maintenant remplacés par des spectromètres capables de résoudre les interférences de raies et les problèmes liés aux effets de matrice. Chaque élément, sous forme neutre ou ionisée, est responsable d'un ensemble de raies d'intensités très variables. L'appareil est donc programmé pour identifier et quantifier les éléments à doser dans l'échantillon.

14.5 APPAREILS SIMULTANÉS ET APPAREILS SÉQUENTIELS

On distingue deux grandes familles d'instruments dont l'une permet le dosage simultané de plusieurs éléments et l'autre, des mesures séquentielles. On rencontre plus souvent des instruments de la première catégorie, à optique fixe, livrés « clefs en mains » pour des applications définies. À leur désavantage, ils ne peuvent faire une analyse exhaustive de l'échantillon.

La mesure d'émission optique par un photomultiplicateur est possible sur une gamme dynamique très étendue. On peut donc doser des éléments dont les concentrations, autrement dit les intensités lumineuses des raies, sont très différentes à partir d'une seule solution.

14.5.1 Appareils à optique fixe comportant un polychromateur

Pour chaque élément sélectionné, on mesure l'intensité d'une ou plusieurs raies, qui constituent autant de *lignes analytiques* ou canaux de mesure. Chacun se termine par un photomultiplicateur qui lui est dédié. Si le montage comporte un réseau concave, la fente d'entrée et les fentes de sortie sont situées sur le pourtour du *cercle de Rowland*, tangent au réseau et dont le diamètre est égal au rayon de courbure du réseau (fig.14.8). Techniquement il n'est pas facile de placer un grand nombre de détecteurs par manque de place, si bien que de plus en plus on préfère le type de montage décrit ci-après.

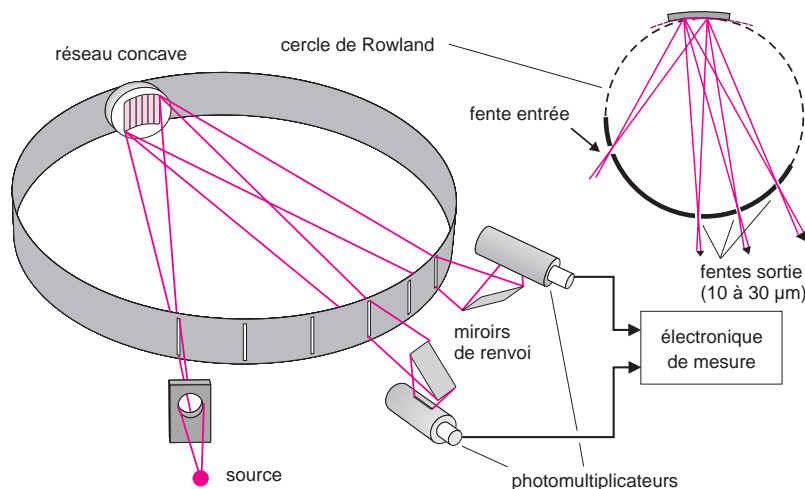


Figure 14.8 Agencement de l'optique d'un appareil à réseau concave et polychromateur à grande distance focale.

Lorsque les raies à détecter sont trop proches on peut avoir recours à des miroirs de renvoi. Plusieurs polychromateurs sont quelquefois associés. En haut, à droite, principe du cercle de Rowland. La partie optique de ces appareils doit être montée sur un socle métallique très stable.

■ En une seule analyse, on peut ainsi doser rapidement près d'une vingtaine d'éléments. La correction du bruit de fond est possible en déterminant simultanément plusieurs raies appartenant à un même élément. La linéarité des mesures s'étend sur une gamme plus étendue qu'en absorption atomique.

14.5.2 Appareils à optique fixe, à réseau échelles

Un montage différent consiste à associer une classe particulière de réseau, dit à *échelle* avec un prisme focalisateur. Il conduit à une double dispersion de la lumière, dans le sens horizontal par le réseau et dans le sens vertical par le prisme lentille. Ce dispositif croisé, dont la distance focale atteint plusieurs mètres, de grande résolution est appelé *séparateur d'ordres*. Il permet l'observation simultanée d'une gamme spectrale étendue, par ex. 200–800 nm (fig. 14.9).

■ Dans un réseau échelle la lumière incidente parvient perpendiculairement aux petits côtés des miroirs qui sont en nombre plus restreint que pour les réseaux traditionnels (par ex., une centaine par mm) (fig. 14.9). L'observation de la lumière diffractée se fait pratiquement sous le même angle, ce qui donne un maximum de luminosité à l'ensemble (réseau « blazé »). Le calcul montre que des radiations dont les longueurs d'onde sont peu différentes sont superposées dans la direction d'observation par suite du grand intervalle séparant deux miroirs successifs. Ce phénomène de multiplexage (superposition des différents ordres n du réseau – n vaut environ 100) est résolu par un élément dispersif croisé, tel un prisme qui utilise la seconde dimension du plan focal pour étaler les différentes images de la fenêtre d'entrée. Le spectre reste stationnaire par rapport à l'optique.

En fin de parcours, la dispersion des « raies » se fait sur une matrice de capteurs dont la réponse fournit quasi simultanément des informations sur des milliers de taches spectrales (fig. 14.10). Il en résulte des analyses plus rapides. Par diverses améliorations, la gamme dynamique de ces capteurs rejoint maintenant celle des photomultiplicateurs.

14.5.3 Appareil à balayage de longueurs d'onde (type monochromateur)

À la différence des appareils précédents, le système dispersif se déplace pour faire défiler les différentes longueurs d'onde devant la fente de sortie qui demeure fixe. Un moteur pas à pas permet une sélection programmée des longueurs d'onde désirées et l'examen séquentiel des lignes spectrales. La lumière issue de la source est analysée soit par un montage d'Ebert (cf. § 9.2), soit par un double monochromateur de type Czerny-Turner afin d'atteindre une très haute résolution optique (quelques nm), comparable à la largeur d'une raie d'émission à cette température, sur un large domaine spectral (160–850 nm). Plusieurs montages de ce type peuvent être placés en série pour constituer des double ou triple monochromateurs de hautes performances sans que les dimensions de l'ensemble ne rendent l'installation trop encombrante.

Ces appareils se distinguent par leur flexibilité. Une source annexe à vapeur de mercure sert comme moyen d'étalonnage interne des longueurs d'onde afin d'assurer un positionnement très rapide du réseau et d'offrir une précision de pointé élevée. Le trajet optique se fait dans une enceinte rigide maintenue sous vide. Ici encore la proximité de certaines raies nécessite un montage mécanique très précis.

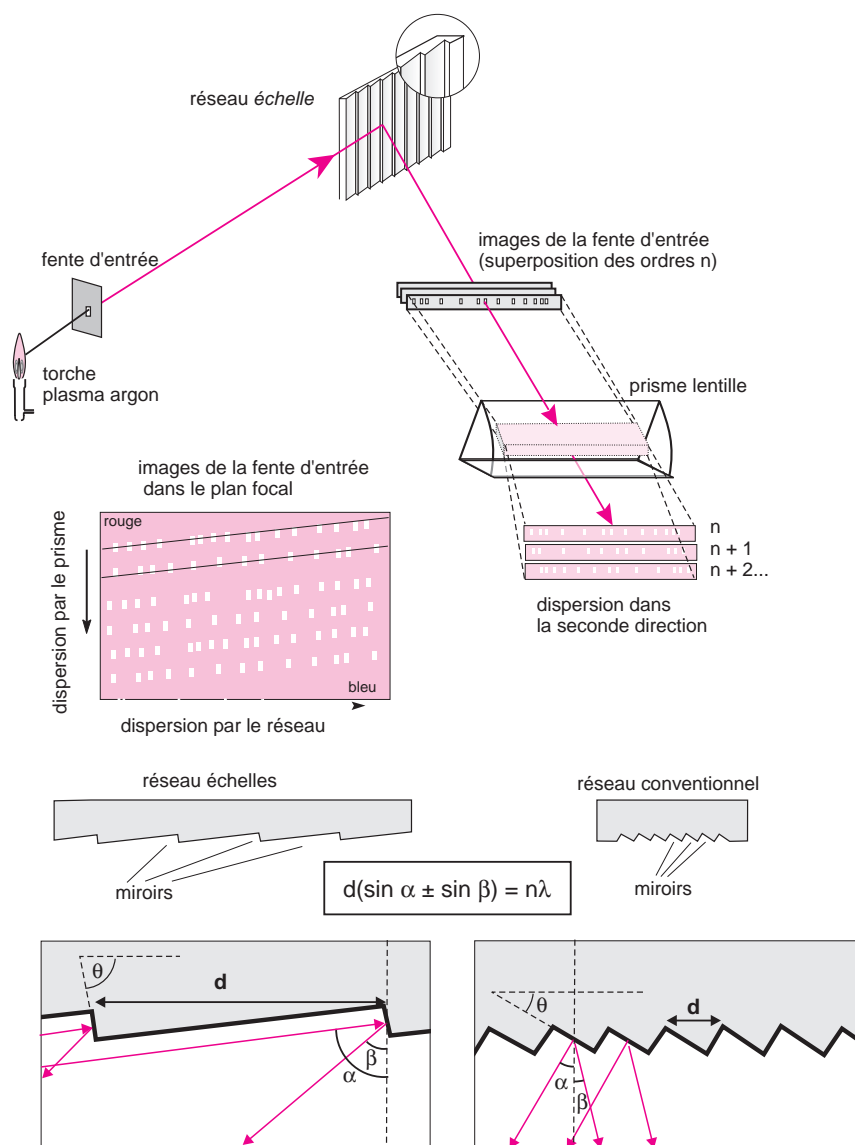


Figure 14.9 Principe de la dispersion dans le plan focal d'un montage associant un réseau échelles et un prisme.

Pour plus de clarté, l'optique associée (lentilles collimatrices et focalisatrices) n'a pas été représentée. Comparaison d'un réseau de diffraction échelle et d'un réseau conventionnel. L'angle de plus forte luminosité du réseau est repéré par l'angle de « blaze » θ (ce terme veut dire *miroiter* en anglais). La formule de base indique quelles sont les longueurs d'onde renvoyées par le réseau pour un angle d'incidence α par rapport à la normale du réseau et pour une direction d'observation faisant l'angle β (le signe + si l'observation est du même côté que le rayon incident par rapport à la normale, et - dans le cas contraire). La résolution peut atteindre celle d'un appareil qui étalerait le spectre sur une longueur de 2 m dans le plan focal.

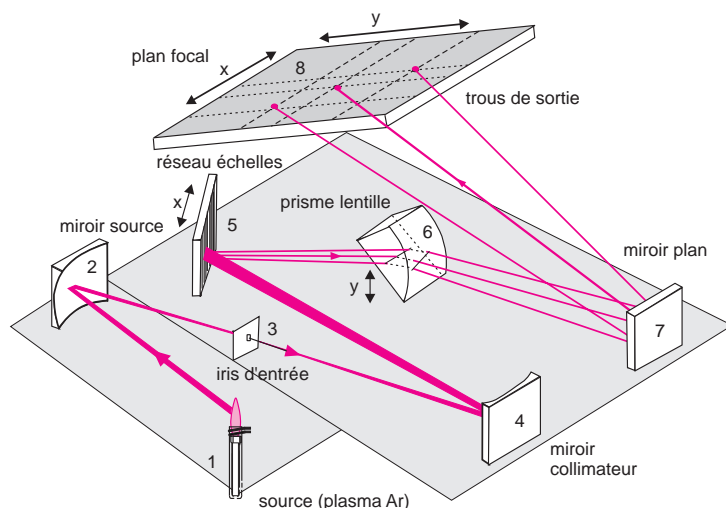


Figure 14.10 Schéma optique d'un spectromètre multicanal à réseau de diffraction à échelle.

Pour plus de clarté, seule la partie centrale du faisceau issu de la source 1 est représentée (ce faisceau devrait recouvrir tout le miroir 2). Le réseau à échelle 5 sépare les radiations présentes dans la source dans le sens horizontal (en x). Le prisme dévie ensuite ces radiations dans le sens vertical (en y). Le parcours de trois lignes spectrales différentes est schématisé. Les images du trou d'entrée 2 sont dans le plan focal 8. Pour détecter ces radiations on peut installer soit des photomultiplicateurs de taille réduite en des endroits spécifiques, soit un capteur à matrice de 10^5 à 10^6 photodiodes (CID ou CCD), équivalent électronique des films photographiques, ce qui permet une couverture spectrale continue de 190 à 800 nm avec une excellente résolution. Une étude complète de l'échantillon est alors possible (dessin exécuté d'après un schéma du modèle 7000 PU de la société Unicam.).

14.6 PERFORMANCES

La rapidité et les limites de détection, qui sont inférieures au ppb pour beaucoup d'éléments, font de l'émission atomique une des grandes méthodes d'analyse élémentaire polyvalente. Avec les appareils comportant un détecteur du type CCD, il est possible de capter le spectre entier en haute résolution (plus de 10 000 raies d'émission) en quelques secondes.

Certains spectromètres acceptent plus facilement des matrices dominantes, tels les boues ou les sols, pour lesquels les éléments Si, Fe et Al sont largement majoritaires. Il faut donc choisir l'appareil en fonction des analyses que l'on effectue.

14.6.1 Seuil de sensibilité et limite de détection du spectromètre

Le seuil de sensibilité de l'instrument varie selon l'appareil et l'élément considéré. On trouve à ce sujet de nombreux tableaux comparatifs qui sont perpétuellement remis en cause avec les progrès faits dans le domaine de l'instrumentation. Le seuil de sensibilité correspond à la concentration minimum de l'élément en solution qui donne un signal dont l'amplitude est égale à trois fois l'écart type calculé sur le blanc analytique. Cette définition classique conduit à des valeurs optimistes, très variables suivant l'élément. La limite de détection de l'instrument représente la concentration d'un élément pouvant être décelé avec 95 % de certitude (cf. chapitre 22).

■ La limite de détection d'une méthode a plus d'intérêt que la limite de détection ci-dessus. On se place généralement dans un domaine de concentrations qui correspond à 50 fois la limite de détection de l'instrument. Lorsqu'il s'agit de doser des ultra-traces, il va de soi que la préparation de l'échantillon exige l'emploi de réactifs et d'eau de très grande pureté.

14.6.2 Pouvoir de résolution

La résolution spectrale est accessible par une mesure expérimentale directe sur un spectre enregistré. Elle correspond à la largeur $\Delta\lambda$ d'un pic d'émission, mesurée à mi-hauteur en prenant les unités du spectre. Cette valeur dépend du système dispersif et de la longueur d'onde.

Le *pouvoir de résolution* d'un spectromètre, c'est-à-dire sa faculté de séparer des raies spectrales de longueurs d'onde très voisines, est défini par R tel que :

$$R = \frac{\lambda}{\Delta\lambda} \quad (14.1)$$

Les appareils d'émission atomique ont des pouvoirs de résolution de l'ordre de 30 000 à 100 000. L'utilisation d'une fente de sortie trop large (bande passante reçue par le photomultiplicateur) dégrade le pouvoir de résolution du spectromètre.

14.6.3 Dispersion linéaire et bande passante

La *dispersion linéaire*, exprimée en millimètres par nanomètre (mm/nm) — ou son inverse, la *dispersion réciproque* en nm/mm) — représente l'écart dans le plan focal entre deux longueurs d'onde qui diffèrent de 1 nm. Elle dépend de plusieurs paramètres dont les distances focales et les largeurs des fentes d'entrée et de sortie de l'instrument. D'une manière générale, meilleure est la dispersion, plus grande est la séparation physique entre deux longueurs d'onde données. La *bande passante*, qu'il ne faut pas confondre avec la largeur de fente, est l'intervalle du spectre, en picomètres, qui correspond à la largeur de la fente de sortie. Cet intervalle est ordinairement plus grand que la largeur de la raie sur laquelle il est centré.

■ Ainsi, si la fente de sortie est de 20 μm et si la dispersion est de 5 mm/nm, la bande passante sera égale à $1 \times (20 \times 10^{-3}) / 5 = 4 \times 10^{-3}$ nm, soit 4 pm.

14.7 COUPLAGE CPG/ÉMISSION ATOMIQUE (CPG/ICP-OES)

La détection par photométrie de flamme est utilisée depuis longtemps en CPG pour la recherche des composés contenant du phosphore ou du soufre. En partant de ce principe il est possible de profiter des hautes températures générées par les plasmas de gaz pour détruire les composés élués de la colonne et recueillir des informations sur leur composition élémentaire, en adaptant un spectromètre d'émission atomique au chromatographe (fig. 14.11).

En choisissant une raie spécifique d'un élément, on obtient un chromatogramme sélectif de tous les composés élués contenant cet élément. C'est alors le domaine des analyses de spéciation par le recherche de composés correspondant à l'association de plusieurs éléments. On évite ainsi les interférences dues aux matrices des échantillons.

■ On peut simplement regretter que cette identification des molécules organiques impose de les détruire, pour finalement n'exploiter que leur composition élémentaire : au cours de cette « boucherie chimique » les informations structurales sont perdues.

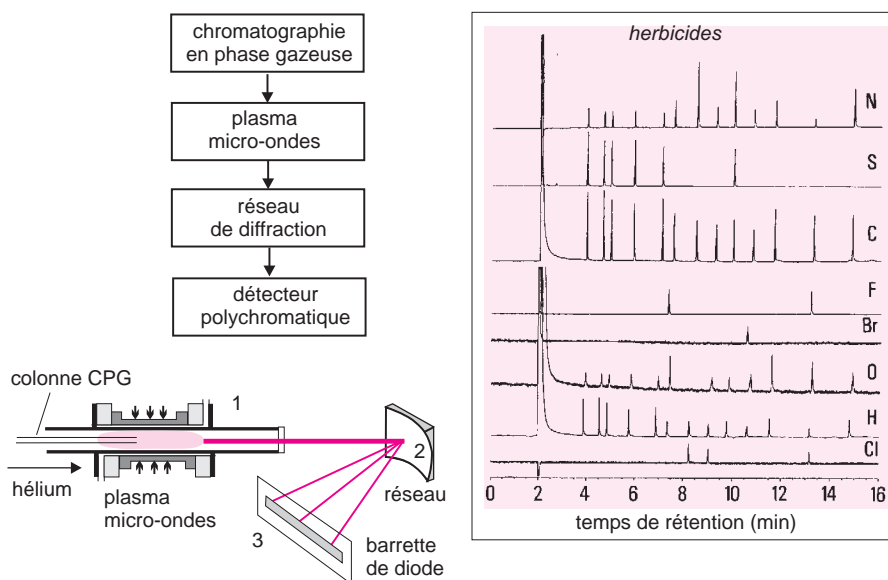


Figure 14.11 Couplage d'un chromatographe en phase gazeuse et d'un spectromètre d'émission atomique.

Les effluents de la colonne capillaire arrivent dans un plasma qui provoque leur décomposition en éléments. Chaque chromatogramme correspond aux composés comportant l'élément recherché. C'est le principe d'une analyse de spéciation. Pour un temps de rétention donné, on a une indication sur la présence de certains atomes dans un même composé. Le plasma est ici généré par chauffage du gaz vecteur (He) au moyen d'un générateur de micro-ondes confinées dans une cavité où débouche la colonne. Noter l'utilisation d'une barrette de diodes pour faire l'analyse simultanée de plusieurs éléments (chromatogrammes issus d'un document de la société Hewlett-Packard).

14.8 APPLICATIONS DE LA SPECTROMÉTRIE D'ÉMISSION ATOMIQUE

Le très grand nombre d'éléments dosables par émission atomique rend cette méthode d'analyse incontournable. Elle permet soit de doser des éléments choisis par avance soit d'identifier les éléments présents dans un échantillon quelconque. En dehors des applications analytiques dans l'industrie en général — recherche, par exemple, des métaux d'usure, trouvés dans les huiles de vidange des moteurs d'automobile ou d'aviation, sans démontage — c'est sans doute dans le domaine de l'environnement qu'elle est devenue indispensable.

Il peut s'agir aussi bien d'analyses sur les productions végétales ou animales (viande, lait), sur les eaux, sur l'air (poussières émises par les incinérateurs), ou sur les sols enfin, pour lesquels des éléments sont présents dans des rapports de concentration énormes, (en relation avec l'épandage des boues industrielles sur les terres agricoles).

Cette méthode a reçu également diverses applications dans le domaine médico-légal ou en médecine clinique (analyse de tissus ou de liquides biologiques). Un de ses avantages est celui de la linéarité de la réponse sur une très grande gamme de concentrations, ce qui permet de traiter des matrices complexes, avec un minimum de préparation. Ainsi, avec une seule solution il est possible de passer du dosage d'un élément concentré à un autre, présent à l'état de trace.

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.aurora-instr.com
www.tja.com
www.varianinc.com
www.leemanlabs.com

www.perkinelmer.com
www.jobinyvon.com
www.spectro-ai.com

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 14.1

Quand un atome émet une radiation, la fréquence du photon correspondant est liée à l'énergie des niveaux entre lesquels la transition a lieu. Selon le principe d'Heisenberg, si l'état excité a une durée de vie Δt , il en résulte une imprécision minimum sur l'énergie ΔE telle que $\Delta E \Delta t > h / 2\pi$.

À partir de cette expression calculer la largeur naturelle de la transition observée à 589 nm pour l'atome de sodium, en admettant que Δt vaut 10^{-9} s.

Exercice 14.2

Afin de doser le plomb dans deux solutions A et B on prépare 5 solutions étalons de concentrations connues en plomb. On s'arrange pour que les solutions à doser et les étalons contiennent la même concentration en magnésium utilisé comme référence interne. Les mesures sont les suivantes :

conc. (mg/L)	signal d'émission (unit. arbit.)	signal Mg
0,10	13,86	11,88
0,20	23,49	11,76
0,30	33,81	12,24
0,40	44,50	12,00
0,50	53,63	12,12
sol A	15,50	11,80
sol B	42,60	12,40

Trouver les concentrations massiques en plomb des deux solutions A et B.

Exercice 14.3

On dit quelquefois que le niveau de résonance de l'atome de sodium est à $16\,960\text{ cm}^{-1}$ du niveau fondamental.

Retrouver, à partir de cette valeur, quelle est la longueur d'onde correspondante et l'énergie de la transition qui lui est associée.

Exercice 14.4

Un réseau à échelle comportant 100 miroirs par mm reçoit la lumière incidente sous un angle de 75° par rapport à la normale au réseau. L'angle d'observation varie de 60° à 65° .

a) Dans quel ordre n doit travailler ce réseau pour pouvoir observer une radiation de $0,35\text{ }\mu\text{m}$ de longueur d'onde ?

b) Calculer les plages spectrales pour la valeur de l'ordre n trouvé précédemment ainsi que pour les ordres $(n - 1)$ et $(n + 1)$.

c) En conclure s'il y a recouvrement ou non des plages spectrales pour ces trois ordres.

Exercice 14.5

Dans la détermination de traces de cuivre dans des sédiments marins par la méthode de Mac Laren, on utilise un appareil d'émission atomique doté d'une torche à plasma. Les mesures sont faites aux longueurs d'onde suivantes : $324,754\text{ nm}$ (émission du cuivre), $324,719\text{ nm}$ et $324,789\text{ nm}$ (pas d'émission : correction du bruit de fond) et $324,739\text{ nm}$ (émission du fer) si on suppose la présence de fer dans l'échantillon.

Dans l'expérience décrite, trois spectres ont été enregistrés dont les résultats sont rassemblés dans le tableau suivant (valeurs lues en μA) :

	324,719 nm	324,739 nm	324,754 nm	324,789 nm
Étalonnage Cu	23,1		63,71	8,1
Étalonnage Fe		$8,75 \times 10^5$	10,5	
Échantillon	27,5	$2,94 \times 10^4$	27,49	9,2

L'étalonnage du cuivre a été réalisé avec une solution contenant 50 ppm de cuivre mais ne contenant pas de fer.

a) Calculer la correction à apporter due au bruit de fond.

b) Calculer le facteur de correction à utiliser pour éliminer l'effet de recouvrement entre le fer et le cuivre.

c) Calculer, en ppm, la quantité de cuivre dans l'échantillon.

Chapitre 15

Spectrométrie de résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN), dont les premiers travaux, vers 1945, sont dus aux physiciens Bloch et Purcell, est très vite devenue une méthode spectroscopique polyvalente irremplaçable dans divers secteurs de la chimie. La RMN permet l'étude des composés en solution ou à l'état solide. Elle sert aussi bien en analyse quantitative qu'en analyse structurale, mais c'est surtout dans ce dernier domaine qu'elle fait preuve de toute sa puissance. La meilleure méthode pour obtenir des renseignements structuraux sur les composés moléculaires, elle revêt donc une importance pratique toute particulière en chimie organique et en biochimie. Utilisée en complément des méthodes de spectroscopie optique et de la spectrométrie de masse, elle permet de préciser la formule développée, la stéréochimie et dans certains cas la conformation du composé étudié. Elle est devenue, pour ces raisons, une des techniques majeures d'étude aussi bien des structures moléculaires que des cristaux, dont on ne saurait se passer. La RMN a longtemps été considérée comme trop peu sensible pour être adaptée aux analyses environnementales. Cette situation est en voie de changer comme en témoigne l'existence de techniques couplées de chromatographie liquide ou d'électrophorèse avec la RMN.

15.1 GÉNÉRALITÉS

La résonance magnétique nucléaire a donné son nom à une méthode exceptionnelle pour résoudre les problèmes de détermination de structure des composés moléculaires organiques et de certains types de matériaux inorganiques. Les spectromètres de RMN sont donc souvent localisés dans les laboratoires de recherche, mais il existe d'autres appareils de mise en œuvre simplifiée faisant appel à ce même phénomène pour des applications de routine (fig. 15.29).

Cette méthode d'étude de la matière peut être décrite en ne choisissant que des exemples relevant du domaine de la chimie organique, l'élucidation des structures moléculaires ayant, en effet, toujours servi de moteur à son développement et aux nombreuses améliorations techniques depuis son origine.

La RMN tire des informations de l'interaction qui peut apparaître entre les noyaux des atomes présents dans l'échantillon quand on le soumet à un champ magnétique intense et constant, produit par un aimant.

Le document de base, fourni par ces appareils, est le *spectre de RMN* (fig. 15.1). Il s'agit d'un diagramme représentant des signaux de résonance. Pour produire ces signaux, on utilise conjointement un second champ environ 10 000 fois plus faible que le précédent, en faisant appel à une source de radiations électromagnétiques du domaine des radiofréquences.

Le spectre de RMN résulte de l'absorption par l'échantillon de certaines des fréquences envoyées par cette source électromagnétique. L'interprétation des signaux (position, aspect, intensité), conduit à un ensemble de renseignements sur l'échantillon, d'autant plus facilement interprétables s'il s'agit d'un composé pur.

Pour comprendre l'origine de ces spectres, très différents des spectres optiques classiques, il faut faire appel au spin des noyaux.

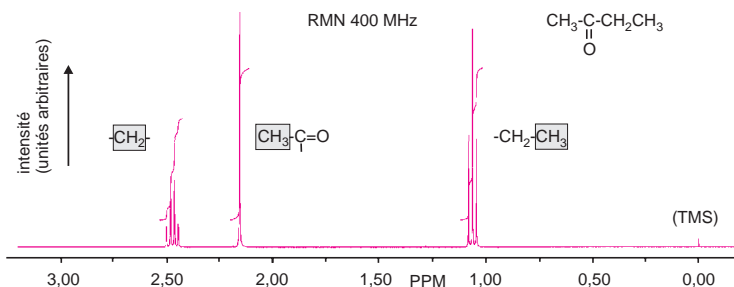


Figure 15.1 Présentation conventionnelle d'un spectre de RMN des atomes d'hydrogène d'un composé organique.

Ici, spectre de la butanone [$\text{CH}_3(\text{C}=\text{O})\text{CH}_2\text{CH}_3$] avec, en superposition, la courbe d'intégration, qui permet d'évaluer les aires relatives des principaux groupes de signaux repérés sur le spectre. La nature de l'échelle des abscisses sera expliquée plus loin.

■ Le spectre de la figure 15.1 est un exemple de RMN dite à une dimension (l'intensité des signaux n'est pas comptée comme seconde dimension). D'autres études par RMN, plus sophistiquées, à 2, 3, 4... dimensions permettent de localiser la position de tous les atomes dans la molécule étudiée. Ce chapitre ne décrit que la RMN 1D (monodimensionnelle) d'échantillons en solution.

15.2 INTERACTION SPIN/CHAMP MAGNÉTIQUE POUR UN NOYAU

Tout noyau atomique — de même que chaque particule subatomique — est caractérisé par un certain nombre de grandeurs intrinsèques, dont le spin $\mathbf{I}^{(1)}$. Ce paramètre vectoriel introduit en mécanique quantique, sans équivalent classique, permet, entre autres, d'expliquer le comportement des atomes dans les milieux où règne une orientation privilégiée. L'existence d'un champ magnétique crée une telle orientation privilégiée dans l'espace pour tout atome baignant dans ce champ. Le spin du noyau est à rapprocher du moment cinétique \mathbf{L} de la mécanique classique dont il a les dimensions ($\text{J}\times\text{s}$). La norme du spin varie d'un type de noyau à un autre car elle est définie à partir du nombre quantique de spin $I^{(2)}$, caractéristique de chaque noyau, dont la valeur peut être nulle ou un multiple positif de $\frac{1}{2}$.

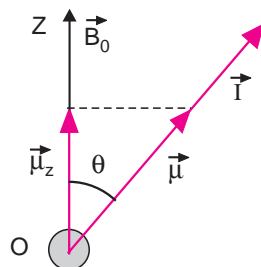
(1) Dans ce livre, tout vecteur est représenté en caractère gras. I , nombre quantique de spin, n'est pas la norme du spin \mathbf{I} .

Un noyau isolé dont le nombre de spin n'est pas nul se comporte comme un petit aimant de moment magnétique $\boldsymbol{\mu}$ ($\text{J} \times \text{T}^{-1}$) tel que :

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \cdot \mathbf{I} \quad (15.1)$$

Ce moment magnétique nucléaire $\boldsymbol{\mu}$ est représenté par un vecteur colinéaire à \mathbf{I} , de même sens ou de sens opposé, suivant le signe de γ qui est appelé *rapport magnétogyrique* (on le désigne aussi par la *constante gyromagnétique*).

Si on soumet un noyau ayant un spin non nul, que l'on imagine comme une sorte d'aiguille aimantée microscopique, à un champ d'induction magnétique \mathbf{B}_0 faisant un angle θ quelconque avec le vecteur spin, il apparaît un couple entre \mathbf{B}_0 et $\boldsymbol{\mu}$ qui modifie l'énergie potentielle E du noyau. En appelant μ_z la projection de $\boldsymbol{\mu}$ sur l'axe Oz, dirigé dans le sens de \mathbf{B}_0 , on aura :



$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0 \quad \text{soit} \quad E = -\mu \cos(\theta) \cdot B_0 \quad \text{ou encore} \quad E = -\mu_z \cdot B_0 \quad (15.2)$$

D'après les règles de la mécanique quantique, μ_z pour un noyau, ne peut prendre que $2I + 1$ valeurs. Il en résulte que dans le champ magnétique \mathbf{B}_0 l'énergie potentielle E ne peut prendre, elle aussi, que $2I + 1$ valeurs. Il en va de même de l'angle θ . La quantification de μ_z est la conséquence des valeurs permises pour la projection m du vecteur spin sur Oz (m est le nombre magnétique de spin). Elles sont données (en unités naturelles $h/2\pi$), par les termes de la suite :

$$m = -I, -I + 1, \dots, I + 1, I$$

En combinant la relation 15.2 avec 15.1, on aboutit à l'expression générale des $2I + 1$ valeurs permises de l'énergie :

$$E = -\gamma \cdot m \cdot B_0 \quad (15.3)$$

Dans le cas où $I = 1/2$, les deux valeurs possibles de E (en joules) correspondent à $m = +1/2$ et $m = -1/2$. Elles sont notées suivant l'usage α et β :

$$E_1(\text{ou } E_\alpha) = -\gamma \frac{1}{2} \frac{h}{2\pi} B_0 \quad \text{et} \quad E_2(\text{ou } E_\beta) = +\gamma \frac{1}{2} \frac{h}{2\pi} B_0$$

■ Cette apparition de plusieurs niveaux d'énergie rappelle l'effet Zeeman qui concerne la séparation des niveaux électroniques, également dans un champ magnétique, d'où le terme quelquefois rencontré en RMN, de séparation Zeeman nucléaire.

La quantification de la projection du vecteur spin sur l'axe Oz lui laisse néanmoins la possibilité de balayer la surface d'un cône de révolution dont l'angle, entre l'axe et l'apothème, peut être calculé, connaissant les normes de $\boldsymbol{\mu}$ et de μ_z ; ce mouvement de précession, autour d'un axe parallèle à celui du champ magnétique (fig. 15.2 et 15.4a), est caractérisé par sa fréquence qui augmente avec l'intensité du champ.

■ Pour se faire une idée concrète du spin nucléaire, on fait souvent le rapprochement, à notre échelle, du mouvement d'une toupie en rotation autour de son axe, qui fait, à un instant donné, un angle θ par rapport à la direction de la pesanteur (le champ de gravité terrestre). La toupie décrit un mouvement gyroscopique autour de cette direction, qui résulte

de la combinaison de son mouvement de rotation autour de son axe propre et du couple de rappel dû au vecteur gravité. Les frottements ralentissant la rotation, l'angle θ augmente de façon continue. Pour un noyau dans le vide, contrairement au principe de la toupie, l'angle demeure fixe au cours du temps, quelle que soit la valeur du champ appliqué, car les normes du vecteur moment magnétique et de sa projection sont quantifiées. Ainsi, pour un noyau dont le nombre de spin est $I = 1/2$, on calcule que les angles permis de \mathbf{I} par rapport à Oz sont d'environ 55° et 125° , en tenant compte des normes du vecteur spin d'une part ($\sqrt{I(I+1)}$), et de sa projection (I) d'autre part. L'angle de $54,74^\circ$, utilisé dans certaines expériences de RMN, est appelé « angle magique ». Pour cette valeur particulière du spin, il correspond à l'angle que fait la diagonale d'un cube avec ses six arêtes adjacentes.

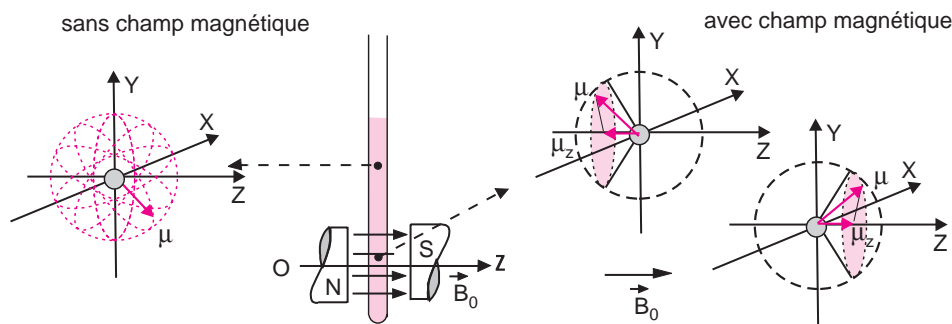


Figure 15.2 Effet d'un champ magnétique sur un noyau de nombre de spin $1/2$ présent dans un composé en solution.

Si le noyau est dans la partie supérieure de l'échantillon, non soumise au champ magnétique extérieur, μ n'a aucune orientation préférentielle. En revanche, dans la partie centrale baignant dans le champ, μ balaie la surface d'un cône de révolution dont l'axe est aligné avec \mathbf{B} . La projection de μ est dans le même sens que \mathbf{B} ou dans le sens opposé.

15.3 LES NOYAUX QUI PEUVENT ÊTRE ÉTUDIÉS PAR RMN

Un nucléide quelconque représenté par ${}^A_Z\text{X}$ a un nombre de spin I non nul si les nombres Z de protons et A de nucléons ne sont pas tous les deux pairs. ${}^1_1\text{H}$, ${}^{13}_6\text{C}$, ${}^{19}_9\text{F}$, ${}^{31}_{15}\text{P}$ ont, par exemple, un nombre de spin $I = 1/2$ tandis que $I = 1$ pour ${}^2_1\text{H}$ (deutérium D) ou ${}^{14}_7\text{N}$. Tous ces noyaux donneront un signal en RMN. En revanche, les noyaux ${}^{12}_6\text{C}$, ${}^4_2\text{He}$, ${}^{16}_8\text{O}$, ${}^{28}_{14}\text{Si}$, ${}^{32}_{16}\text{S}$ auront un nombre de spin nul et ne pourront pas être étudiés par RMN. Dans l'ensemble, plus de la moitié des nucléides stables connus (au moins un isotope par élément) conduisent à un signal de RMN, mais la sensibilité varie énormément suivant les noyaux. Ainsi le proton, nom commun du noyau ${}^1_1\text{H}$, ou bien le ${}^{19}_9\text{F}$, sont plus faciles à détecter que le ${}^{13}_6\text{C}$, beaucoup moins sensible que le proton et qui ne représente que 1 % de l'élément carbone.

15.4 THÉORIE DE BLOCH POUR UN NOYAU DONT $I = 1/2$

À notre échelle, dite macroscopique, la plus infime quantité d'un composé moléculaire est constituée d'un nombre considérable de molécules individuelles. On est donc toujours en présence d'une collection si gigantesque de noyaux que les signaux de RMN reflètent des comportements statistiques, comme en spectroscopie optique.

Considérons un ensemble de noyaux identiques dont le nombre de spin est $I = 1/2$.

En l'absence de champ extérieur, les orientations des vecteurs spin individuels ont un caractère aléatoire et varient constamment. D'un point de vue énergétique, ces noyaux forment une seule population, à l'état dit *dégénéré* (fig. 15.2). Lorsqu'on place ces noyaux dans le puissant champ d'induction magnétique \mathbf{B}_0 extérieur (orientation Oz) une interaction naît entre chaque petit vecteur magnétique nucléaire et ce champ (cf. 15.2).

Il apparaît donc deux groupes de noyaux dont les énergies correspondent à E_1 ou E_2 , définies précédemment selon le sens de la projection de leur vecteur spin sur l'axe Oz , (fig. 15.3).

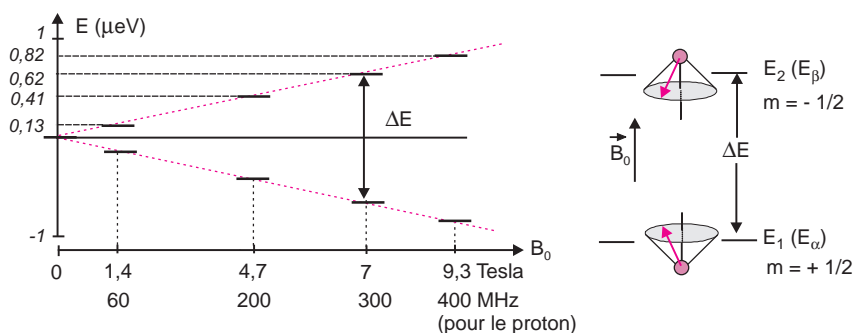


Figure 15.3 Représentation de l'éclatement entre les niveaux énergétiques d'un noyau de nombre de spin $I = 1/2$ placé dans un champ magnétique.

Les quatre valeurs choisies du champ B_0 correspondent, pour le proton, à des appareils commerciaux dits à 60, 200, 300 et 400 MHz. (B_0 représente la densité de flux magnétique exprimée en tesla : 1T équivaut à 10 000 gauss).

La différence ΔE , entre les deux états, est de :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 \quad (15.4)$$

ΔE est proportionnel au champ B_0 (fig. 15.3). Ainsi, pour le proton, si $B_0 = 1,4$ T, l'écart d'énergie a une valeur très faible : $3,95 \times 10^{-26}$ J, soit $2,47 \times 10^{-7}$ eV. Quant au rapport $(E_2 - E_1)/B_0$, il ne dépend que de γ , c'est-à-dire du noyau étudié (tabl. 15.1).

La population, qui rassemble les noyaux situés dans l'état d'énergie E_2 , est un peu moins nombreuse que dans l'état E_1 légèrement plus stable. L'expression 15.5 permet de calculer le rapport des deux populations (équilibre de répartition de Boltzmann).

$$R = \frac{N_2}{N_1} = \exp \left[-\frac{\Delta E}{kT} \right] \quad (15.5)$$

(pour ^1H , on trouve $R = 0,999964$ si $T = 300$ K et $B_0 = 5,3$ T

avec $k = 1,38 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{at}^{-1}$).

De ce fait, seul le léger excès de la population E_1 sera responsable du signal de RMN. En augmentant la valeur du champ fourni par l'aimant de l'appareil, on creusera l'écart entre les deux populations et on aura donc une sensibilité accrue. Graphiquement, on explique la faible aimantation de la solution échantillon en rapportant à partir d'un même point tous les vecteurs individuels μ . Le vecteur résultant M_0 est appelé *aimantation macroscopique* (fig. 15.4b). M_0 est souvent envisagé pour expliquer l'apparition du signal observé quand il y a résonance.

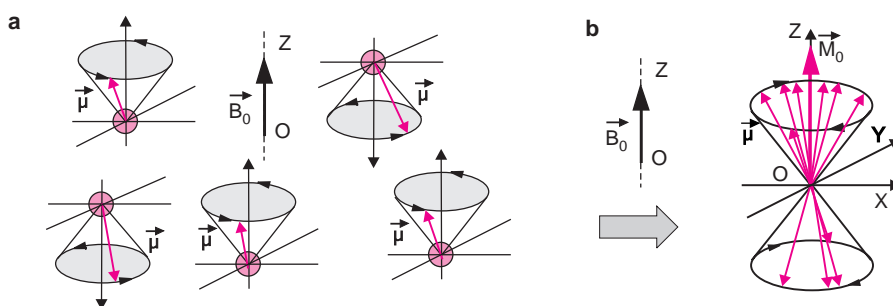


Figure 15.4 Précession et magnétisation.

a) Instantané figurant le mouvement de précession du vecteur spin de 5 noyaux indépendants dans le champ magnétique extérieur; b) vecteur magnétisation macroscopique résultant des orientations individuelles d'un grand nombre de noyaux. L'échantillon en solution devient donc faiblement aimanté. M_0 est un objet auquel s'appliquent les lois de l'électromagnétisme.

15.5 FRÉQUENCE DE LARMOR

D'un point de vue analytique, si on peut mesurer la différence d'énergie qui sépare dans un champ B_0 les deux populations (dans le cas où $I = 1/2$), on pourra identifier le noyau correspondant d'après sa constante gyromagnétique γ . Pour évaluer cette différence d'énergie on va, comme en spectroscopie optique, créer les conditions de passage de l'un à l'autre des niveaux, c'est à dire provoquer un signal de résonance. Pratiquement on irradie les noyaux placés dans le champ magnétique avec une source de radiations électromagnétiques de fréquence variable dont la direction de propagation est perpendiculaire au champ extérieur. Il y aura absorption si :

$$h\nu = E_2 - E_1 \quad (15.6)$$

La relation 15.4 conduit alors à la relation fondamentale de résonance (15.7) :

$$\nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (15.7)$$

Cette expression très importante et générale, est appelée **relation de Larmor**. Elle relie le champ magnétique dans lequel baignent les noyaux considérés et la fréquence de la radiation électromagnétique qui provoque la condition de résonance (tabl. 15.1).

■ La radiofréquence, qui provoque l'échange entre les deux niveaux, est également la fréquence dite de précession de Larmor à laquelle le vecteur spin tourne autour de la direction

moyenne Oz . Larmor, physicien Irlandais dont les travaux sont antérieurs à ceux concernant la RMN, a montré, par un raisonnement indépendant que ω , pulsation ou fréquence angulaire de rotation du vecteur spin autour de Oz , a pour valeur :

$$\omega = \gamma \cdot B_0$$

Comme $\omega = 2\pi\nu$, on retrouve la relation démontrée dans le cas de la RMN. Ces deux approches sont différentes : l’une aboutit à la fréquence du quantum qui sépare les deux niveaux et l’autre, à la fréquence mécanique de précession. Ces deux fréquences ont même valeur.

Tableau 15.1 Valeurs de g pour les noyaux N les plus étudiés en RMN.

noyau N	$g(\text{rad} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{T}^{-1})$	sensibilité
^1H	$2,6752 \times 10^8$	1
^{19}F	$2,5181 \times 10^8$	0,83
^{31}P	$1,084 \times 10^8$	$6,6 \times 10^{-2}$
^{13}C	$0,6283 \times 10^8$	$1,8 \times 10^{-4}$

La fréquence de Larmor d’un noyau croît avec B_0 . Elle est située dans le domaine des ondes courtes et varie si le champ est de 1 tesla, de 42,5774 MHz pour le noyau d’hydrogène (proton), à 0,7292 MHz pour l’or, (tableau 15.2). Les appareils sont désignés par la fréquence à laquelle *les protons* entrent en résonance, même s’ils sont prévus pour faire l’étude d’autres noyaux.

Tableau 15.2 Valeurs, en MHz, de quelques fréquences de résonance pour $B_0 = 1 \text{ T}$.

noyau N	^1H	^{19}F	^{31}P	^{13}C	^{15}N
fréquence ν	42,58	40,06	17,24	9,71	4,32

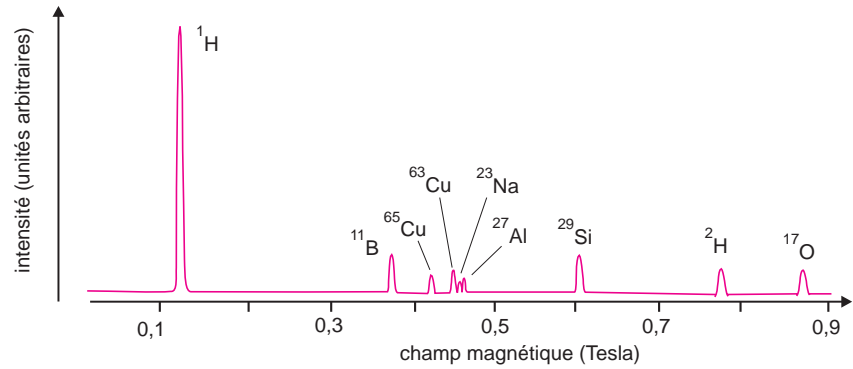


Figure 15.5 Spectre de RMN d’un échantillon d’eau placé dans un récipient de verre borosilicaté, observé à une fréquence de 5 MHz (le champ est exprimé en Tesla ; document Varian). Il n’existe pas d’appareils commerciaux de ce type, la RMN étant une méthode réservée à des examens plus approfondis que pour rechercher la composition élémentaire des d’échantillons.

■ En partant de ce principe, il a tout d'abord été construit des appareils expérimentaux multinoyaux qui permettaient de faire un balayage de champ sur une vaste plage, en maintenant la radiofréquence fixe. Cela permettait de reconnaître qualitativement et globalement les éléments les plus faciles à détecter de l'échantillon étudié par leurs fréquences caractéristiques de résonance (tabl. 15.2 et fig. 15.5).

15.6 OBTENTION DU SPECTRE PAR RMN IMPULSIONNELLE

Dans la partie de l'instrument où l'échantillon est introduit, appelée *sonde*, on provoque la résonance des noyaux en superposant à \mathbf{B}_0 , un champ faible oscillant \mathbf{B}_1 , apporté par un solénoïde parcouru par un courant alternatif (générateur de radiofréquences).

Pour comprendre l'interaction avec le noyau, du champ \mathbf{B}_1 , apporté par l'onde électromagnétique, on considère qu'il résulte de la composition de deux vecteurs de normes moitié, tournant en sens inverse dans le plan xOy avec la même vitesse angulaire (fig. 15.6). Seul le vecteur tournant dans le même sens que le mouvement de précession peut interagir avec le noyau. La règle de Lorentz montre que \mathbf{B}_0 est soumis à une force perpendiculaire à \mathbf{B}_1 et à \mathbf{B}_0 .

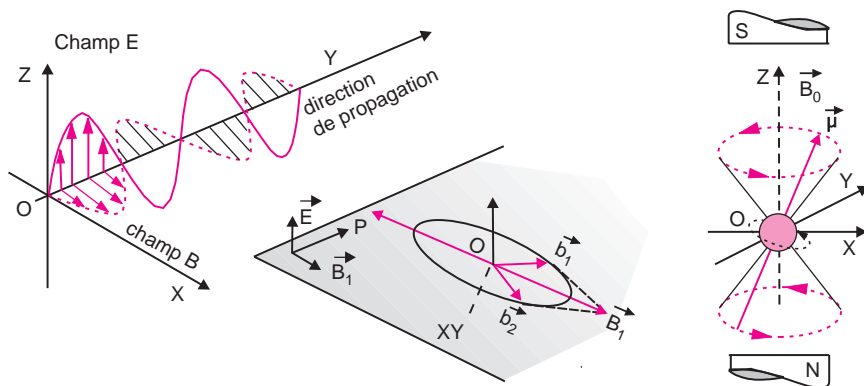


Figure 15.6 Représentation d'une onde électromagnétique.

En tout point du plan xOy la composante magnétique de l'onde peut être dissociée en deux vecteurs de normes moitié b_1 et b_2 tournant en phase à des vitesses opposées. Ici, seul b_2 peut basculer le noyau dans la population E_2 .

Pour que \mathbf{B}_1 soit orienté convenablement, il faut que l'axe de propagation de la radiofréquence soit perpendiculaire à Oz (fig. 15.7). Quand la radiofréquence de la source et la fréquence de précession sont identiques, les conditions sont réunies pour qu'il y ait transfert d'énergie de la source vers les noyaux. Des noyaux dans l'état E_1 passent alors dans l'état E_2 : les populations sont modifiées.

Avant irradiation, les vecteurs individuels μ sont déphasés les uns par rapport aux autres, ce que l'on traduit par la représentation du vecteur \mathbf{M}_0 , aligné dans la direction Oz (fig. 15.4).

Quand on atteint la condition de résonance les vecteurs individuels se mettent à tourner en phase avec \mathbf{B}_1 ce qui fait basculer \mathbf{M}_0 d'un angle α dont on maîtrise la valeur en ajustant

temps et puissance d'irradiation. La figure 15.7 traduit ce phénomène avec quelques vecteurs individuels se rejoignant. De ce fait, \mathbf{M}_0 acquiert une composante \mathbf{M}_{xy} dans le plan horizontal, maximum quand $\alpha = \pi/2$, et conserve une composante \mathbf{M}_z , variable, dans la direction Oz (sauf si $\alpha = \pi/2$), la fréquence de rotation du vecteur magnétisation étant celle du mouvement de précession. Le spin de certains noyaux prend la seconde orientation permise (dans le cas où $I = 1/2$). Lorsque l'irradiation cesse, le système revient progressivement à l'état d'équilibre initial. Une bobine détectrice décèle la composante suivant la direction Oy (fig. 15.7).

■ Pour imaginer ce qui se passe dans la sonde de l'appareil, le raisonnement courant consiste à se placer comme un observateur lié à un trièdre tournant autour de l'axe Oz à la fréquence du mouvement de précession des noyaux concernés (fig. 15.7). Pour simplifier, considérons un seul type d'écran, donc une seule fréquence de précession. Quand la radiofréquence à la même valeur, les noyaux semblent, pour l'observateur, ne ressentir que la composante tournante du champ (perpendiculaire à Oz). Le vecteur magnétisation commence à basculer. Après l'impulsion, les moments magnétiques individuels perdent leur cohérence de phase par interaction entre les spins des noyaux voisins plus vite qu'ils ne se réorientent, pour retrouver la répartition de Boltzmann des populations de départ. \mathbf{M}_0 perd donc sa composante dans le plan xOy , sans avoir retrouvé, pour autant, sa valeur initiale dans la direction Oz, ce qui peut demander beaucoup plus de temps.

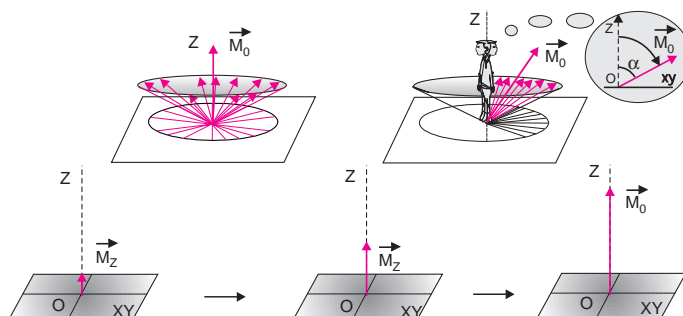


Figure 15.7 Basculement du vecteur magnétisation \mathbf{M}_0 et retour à l'équilibre après résonance.

Représentation imagée où ne sont figurés que les vecteurs individuels marquant le déséquilibre des populations (numériquement). Un observateur tournant à la fréquence de précession verrait le vecteur magnétisation basculer d'un angle α . Retour progressif de la projection \mathbf{M}_z de \mathbf{M}_0 à la situation d'origine.

■ Le procédé actuel d'obtention du spectre par calcul (RMN d'émission), n'existait pas à l'origine. Une autre méthode était utilisée. On recherchait la résonance en modifiant légèrement B_0 grâce à un enroulement de quelques spires autour des pièces polaires de l'aimant principal (fig. 15.8). Comme il s'agissait d'un balayage de champ, ces appareils fonctionnaient généralement à fréquence fixe (le spectre étant néanmoins repéré en Hz, puisque la relation de Larmor montre qu'il est possible de faire correspondre champs et fréquences). Cette RMN d'absorption, quasiment abandonnée des constructeurs, correspondait aux appareils à onde continue. Ce procédé, pour rechercher le signal, n'est pas sans rappeler le mode d'enregistrement séquentiel des spectres optiques, ou bien, dans la vie de tous les jours, la recherche d'une station FM sur un récepteur radio. Avec ce principe, la qualité du spectre ne dépend que d'une très faible fraction du temps total d'enregistrement. Les appareils à transformée de Fourier font un meilleur usage du temps de mesure.

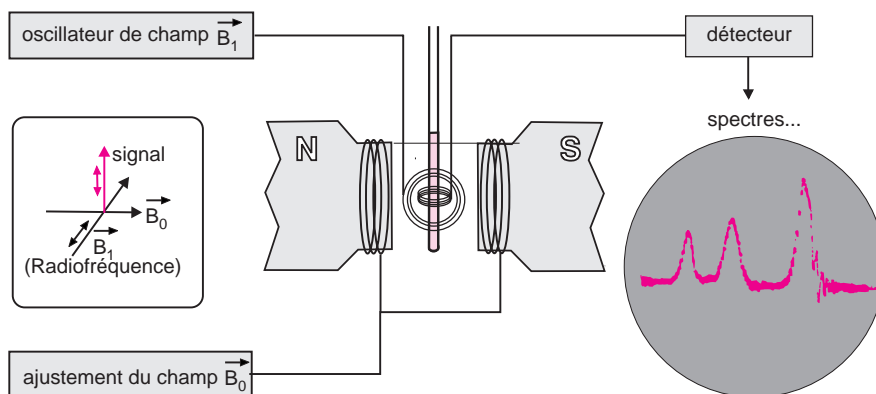


Figure 15.8 Appareil de RMN à onde continue.

Noter l'agencement des différents enroulements au niveau de la sonde entre les pièces polaires de l'aimant et les orientations des différents champs. À droite un enregistrement historique (1951) du spectre des protons de l'alcool éthylique. Les trois signaux correspondent aux atomes d'hydrogène du CH_3 , du CH_2 et du OH . On comprendra mieux après avoir lu le § 15.8.

Techniquement, l'échantillon est irradié au moyen d'un générateur de fréquence ν qui envoie une forte impulsion de quelques microsecondes ce qui est un moyen d'exposer l'échantillon à une bande de fréquences entourant la valeur ν , comme ferait un flash de lumière blanche (pour prendre exemple d'une lumière polychromatique par rapport à une lumière monochromatique). À 300 MHz, par exemple, il faut, pour irradier tous les protons quel que soit leur environnement, une bande de fréquence recouvrant au moins 6 000 Hz. Dans ces conditions, une faible fraction de chaque type de protons (mais pas *tous* les protons), capte la fréquence qui provoque leur résonance.

La situation d'un composé qui conduit à un spectre comportant des dizaines de fréquences est évidemment très complexe et ne saurait trouver de représentation imagée satisfaisante. \mathbf{M}_0 se dissocie en plusieurs vecteurs dont chacun précesse autour de la direction du champ avec sa propre fréquence qui n'est plus celle du repère tournant (la figure 15.7 est une approche imagée très simplifiée). Pendant le retour à l'équilibre, qui peut durer plusieurs secondes, l'appareil enregistre un signal complexe, dû à la combinaison des différentes fréquences de précession présentes, dont l'intensité décroît de manière exponentielle (fig. 15.9). Cet interférogramme qui s'amortit au cours du temps est appelé FID, des initiales de l'expression anglaise *free induction decay*, que l'on nomme en français par *décroissance d'induction libre*. Le signal correspond à chaque instant à une valeur numérique globale qui prend en compte l'état de toutes les fréquences des noyaux en résonance à cet instant. Il se prête aux calculs de Fourier qui vont permettre de transformer ce signal obtenu en *fonction du temps* en un spectre classique établi en *fonction des fréquences*.

Ce procédé, dit à *onde pulsée*, correspond à une méthode simultanée, en ce sens que l'appareil acquiert à chaque instant un renseignement sur toutes les fréquences présentes. Le développement majeur de la RMN actuelle résulte de la généralisation de ce procédé, qui permet l'étude des noyaux peu sensibles, comme le ^{13}C par exemple, et se prête à toutes les ressources de l'informatique.

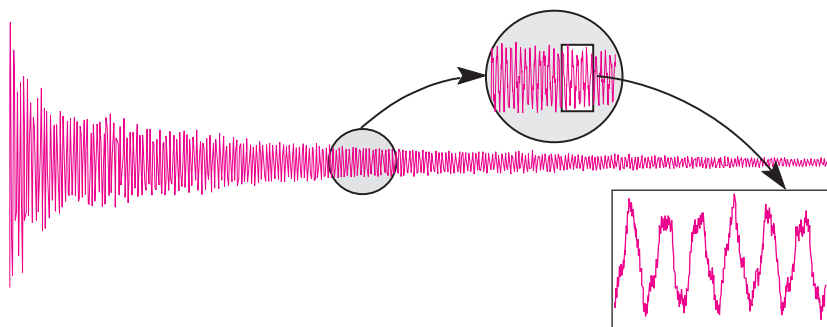


Figure 15.9 Interférogramme de la fluoroacétone (^{13}C) obtenu avec un appareil à onde pulsée.

Le signal $I = f(t)$, converti en spectre classique $I = f(\nu)$ par transformée de Fourier, est celui du spectre de la figure 15.16. L'interférogramme, capté en quelques secondes d'enregistrement, peut être réédité plusieurs dizaines de fois avant de passer à la transformée de Fourier finale. Cette accumulation de FID permet d'améliorer le rapport signal/bruit de fond.

15.7 LES PROCESSUS DE RELAXATION DES NOYAUX

Après l'impulsion de radiofréquence, \mathbf{M}_0 retrouve sa valeur d'équilibre d'avant l'irradiation en un temps variable dépendant du milieu (fig. 15.10). Ce retour est fonction, d'une part, de la perte de cohérence de phase (temps de relaxation T_2), appelé temps de relaxation transverse (interactions spin/spin), et d'autre part, de la reconstitution des populations à leur état initial (temps de relaxation T_1), appelé temps de relaxation longitudinale (interactions du spin avec le réseau). Pour les solutions, T_1 ne dépasse pas quelques secondes (pour ^1H), alors qu'il peut atteindre plusieurs heures avec les solides. Il faut donc bien dissocier les deux composantes de \mathbf{M}_0 . La connaissance des durées de vies T_1 et de T_2 apporte des informations très utiles sur la structure des échantillons analysés. T_1 diminue quand la viscosité du milieu augmente, ce qui se traduit par un élargissement des bandes. T_2 se répercute aussi sur la largeur des signaux. Un composé pur conduit à un spectre dont les signaux sont plus larges qu'en solution.

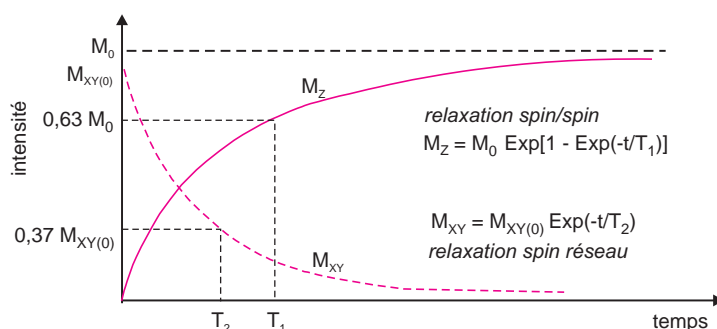


Figure 15.10 Les deux processus de relaxation des noyaux.

Évolution au cours du temps des paramètres de relaxation spin/spin et spin/réseau. En d'autres termes, le réseau représente le composé en solution dans le solvant. Plus le milieu est rigide, plus T_2 est petit.

15.8 LE DÉPLACEMENT CHIMIQUE

Généralement, au sein d'une molécule, chaque atome se trouve dans un environnement rapproché qui lui est propre si bien que la valeur du champ extérieur atteignant son noyau lui est spécifique — à moins qu'il y ait des éléments de symétrie particuliers dans la molécule. Ces variations locales de champ ont pour origine les électrons des liaisons qui par leur circulation créent un très faible champ induit qui s'oppose au champ extérieur. Cet effet d'écran magnétique, appelé *blindage*, conduit à un décalage de la fréquence de résonance par rapport à celle qu'on observerait pour le même noyau dans le vide (fig. 15.1).

Cette constatation est à la base de l'exploitation principale de la RMN : au lieu de chercher à observer tous les noyaux présents répartis sur une bande de fréquence de plusieurs dizaines de mégahertz, on va se focaliser sur l'étude d'un seul type de noyau à la fois. Autrement dit on « zoome » sur un intervalle très réduit de fréquences (par exemple 1 000 Hz) afin d'étudier avec soin les différents signaux qui apparaissent et dépendent de chaque composé.

L'effet d'écran est quantifié au moyen de la *constante d'écran* σ qui apparaît dans la formule 15.8 reliant le champ effectif qui atteint le noyau avec le champ extérieur \mathbf{B}_0 :

$$B_{\text{eff}} = B_0(1 - \sigma) \quad (15.8)$$

Toute variation de σ se répercute sur la fréquence de résonance du noyau correspondant. Ce phénomène est appelé *déplacement chimique*. On observe autant de déplacements chimiques différents que la molécule comporte de valeurs d'écran σ différentes. En conséquence, les grosses molécules conduisent à des spectres complexes par suite de très nombreux effets d'écran.

Dans le cas d'un noyau i pour lequel $I = 1/2$, la relation de Larmor devient, en faisant intervenir, cette fois-ci, le champ effectif \mathbf{B}_{eff} :

$$\nu_i = \frac{\gamma}{2\pi} B_0(1 - \sigma_i) \quad (15.9)$$

■ Pour le proton ^1H l'expression 15.9 conduit à un décalage de 1 Hz de la fréquence de résonance pour une variation du champ ambiant de $2,3 \times 10^{-8} \text{ T}$, et pour une variation de 10^{-4} T [1 gauss], la différence de fréquence devient de 4 258 Hz. C'est pourquoi, tout l'environnement de l'aimant doit être parfaitement contrôlé pour maintenir la stabilité du champ \mathbf{B}_0 de l'appareil de RMN. Par exemple la température est maintenue au 1/100 de degré près. Dans ces conditions, la construction d'appareils de RMN mobiles est un exploit (fig. 15.29). Pour réduire également les hétérogénéités de champ, l'échantillon est mis en rotation dans un tube à paroi mince.

15.9 MESURE DES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES

D'après ce qui précède, les plus faibles variations du champ se répercutent sur les fréquences de résonance. Il serait donc hasardeux de vouloir comparer des spectres ou identifier des composés à partir des fréquences absolues des signaux obtenus à des moments ou avec des appareils différents. Pour cette raison on repère les déplacements chimiques dans une échelle relative $\Delta\nu/\nu$ qui, par nature, est indépendante de l'appareil. Pour cela, on ajoute au composé un standard interne dont on sait qu'il ne donne qu'un signal pour servir de

référence et on divise l'écart de fréquence $\Delta\nu$ entre chaque signal du composé étudié et celui du standard, par la fréquence propre ν_{app} de l'appareil pour le noyau considéré.

Les valeurs obtenues sont exprimées en parties par million (ppm). Ainsi, pour calculer le déplacement chimique δ_i (ppm) correspondant à un signal de fréquence ν_i par rapport à un composé de référence ($\nu_{\text{réf}}$), on repère simplement $\Delta\nu$ (il n'est pas besoin de connaître $\nu_{\text{réf}}$).

$$\delta_i = \frac{\nu_i - \nu_{\text{réf.}}}{\nu_{\text{appareil}}} \cdot 10^6 = \frac{\Delta\nu}{\nu_{\text{appareil}}} \cdot 10^6 \quad (15.10)$$

Le produit de référence utilisé à la fois en RMN ^1H et ^{13}C est le tétraméthylsilane (TMS), composé inerte et volatil (Eb 27 °C), qui donne un seul signal en RMN ^1H (les douze protons sont équivalents) et en RMN ^{13}C (pour les quatre carbones). Il sert d'origine dans l'échelle des déplacements chimiques (fig. 15.11). Sa fréquence de résonance est inférieure, dans pratiquement tous les cas, aux fréquences de résonance des autres composés organiques (échelle δ positive). δ ne dépasse pas 15 ppm en RMN ^1H , mais atteint 250 ppm en RMN du ^{13}C .

- Le signal du TMS est positionné à droite du spectre, respectant ainsi l'habitude selon laquelle, en spectroscopie, le paramètre énergétique porté en abscisse, diminue quand on se déplace de la gauche vers la droite du spectre.

L'échelle δ permet d'établir des tables de corrélation empiriques des déplacements en fonction des structures chimiques, valables quel que soit l'appareil (tabl. 15.5 et 15.6). La relation 15.10 montre bien que si on compare les spectres d'un même composé, enregistrés avec deux appareils dont les champs \mathbf{B}_0 font entre eux un rapport k , les fréquences des signaux homologues pour les deux spectres étant dans ce même rapport k , les valeurs de δ resteront identiques. Ces tables ne sont pas toujours suffisantes pour faire une attribution correcte des signaux. On fait aussi appel à des logiciels d'aide à l'interprétation.

15.10 NOYAUX BLINDÉS OU DÉBLINDÉS

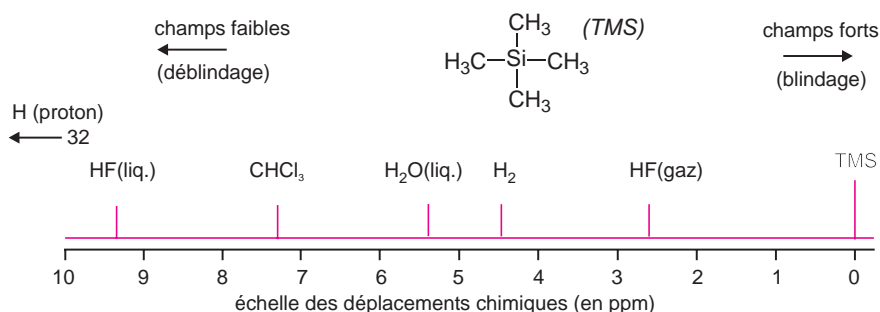


Figure 15.11 Déplacements chimiques de quelques composés en RMN du proton. Effets d'écran avec un appareil qui fonctionne à une fréquence fixe.

En ce qui concerne la RMN, les molécules en solution diluée forment des entités indépendantes sans interaction entre elles. En revanche, au sein d'une molécule, l'environnement électronique et stérique de chaque noyau crée un rempart plus ou moins efficace qui le protège de l'effet du champ extérieur B_0 . C'est l'origine du déplacement chimique. Plus cet effet d'écran est marqué, plus les noyaux sont dits *blindés* : il faut augmenter la valeur du champ B_0 pour faire apparaître la résonance, du moins lorsqu'on se réfère à un appareil à onde continue fonctionnant à fréquence fixe. Si l'on regarde un spectre, on dira que les signaux situés à droite résonnent à *champ fort*, et, en corollaire, que les signaux à gauche correspondent à des noyaux *déblindés* et qu'ils résonnent à *champ faible* (fig. 15.11).

15.11 FACTEURS AFFECTANT LES DÉPLACEMENTS CHIMIQUES

L'examen d'un grand nombre de spectres de RMN fait apparaître des facteurs généraux responsables d'effets prévisibles et cumulables sur le déplacement chimique.

15.11.1 Effets de substitution et d'hybridation

Le simple remplacement d'un hydrogène par un reste carboné R produit un déblindage des protons restants. L'effet atteint 0,6 ppm lorsqu'on passe de RCH_3 à CHR_3 . Cet effet peut atteindre 40 ppm en RMN ^{13}C . L'état d'hybridation des atomes de carbone influe de manière encore plus nette la position des signaux.

Ces variations sont dues à l'*anisotropie* des liaisons chimiques, c'est-à-dire à la non-homogénéité de la densité électronique autour des atomes liés, à laquelle peut s'ajouter l'effet de petits champs magnétiques induits par circulation des électrons. Ainsi les protons éthyléniques sont déblindés parce que situés dans un plan appauvri en électrons. Inversement, les protons acétyléniques situés dans l'axe de la liaison CC sont plongés dans un environnement plus riche en électrons et sont par conséquent blindés. Quant aux protons aromatiques, ils sont fortement déplacés vers les champs faibles car, à l'effet d'anisotropie précédent, s'ajoute un petit champ local généré par le « courant de cycle », qui se superpose au champ principal (fig. 15.12).

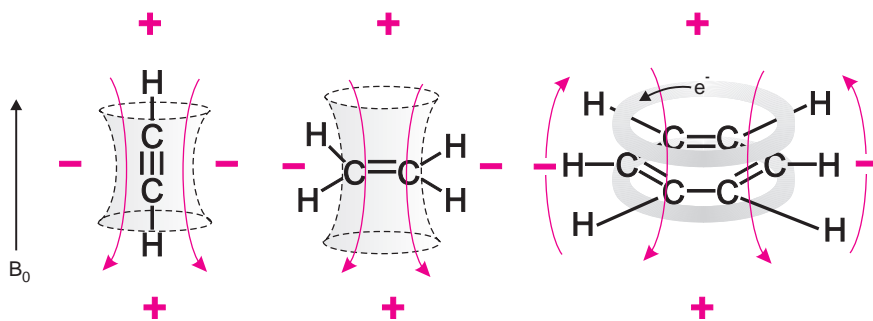


Figure 15.12 Effets d'anisotropie et de champs locaux induits.

La présence de liaisons π , est traduite ici sous forme de zones où on a un effet de blindage (+) ou de déblindage (-). Les protons éthyléniques sont à l'extérieur d'une sorte de double cône de protection et les protons aromatiques subissent l'effet de la circulation des électrons de cycle dans deux volumes toriques.

15.11.2 Effets de résonance et effets inductifs

Les déplacements chimiques des composés organiques sont sensibles à la délocalisation plus ou moins grande des électrons des liaisons. L'écriture des formes mésomères limites rend compte de cette délocalisation (fig. 15.13).

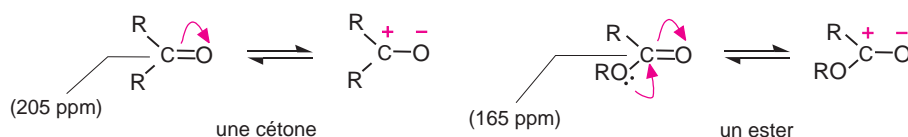


Figure 15.13 Effets de résonance pour les composés carbonyles.

Si on compare le carbonyle d'une cétone avec celui d'un ester, on note que pour ce dernier le carbone est moins déblindé que celui de la cétone dont le caractère est plus électropositif. En RMN du ^{13}C le signal du carbonyle est vers 205 ppm pour une cétone et pour un ester vers 165 ppm.

Il est donc compréhensible que les effets électroniques qui modifient la polarité des liaisons se répercutent sur les déplacements chimiques. Le tableau 15.3 illustre l'effet de l'électronégativité de l'halogène X sur la position du signal du groupe méthyle dans la série des halogénures d'alkyle $\text{CH}_3\text{-X}$. Comparés à la position du signal des protons du méthane, on observe que les déplacements du signal croissent dans le même sens que l'électronégativité de X.

Tableau 15.3 Influence de l'électronégativité χ de l'halogène sur δ (réf. TMS)

	$\text{CH}_3 \text{ F}(\chi = 4)$	$\text{CH}_3 \text{ Cl}(\chi = 3,2)$	$\text{CH}_3 \text{ Br}(\chi = 3)$	$\text{CH}_3 \text{ I}(\chi = 2,6)$
δ_{H} (ppm)	4,5	3	2,7	1,3
δ_{C} (ppm)	75	30	10	-30

15.11.3 Effets divers (solvants, liaisons hydrogène et matrice)

Les solvants, généralement sans atomes d'hydrogène, utilisés pour diluer les composés organiques étudiés en RMN ^1H ou ^{13}C , influencent la position des signaux. Le solvant, beaucoup plus abondant que le soluté, conduit avec ce dernier dont la concentration est de l'ordre de quelques pourcents, à des associations dont la stabilité dépend des polarités respectives. En conséquence, les tables de corrélation doivent préciser la concentration et le solvant utilisés.

■ En RMN ^1H , la position du signal du chloroforme dans des mélanges chloroforme/toluène passe de 7,23 ppm ; (90 % chloroforme/10 % toluène *v/v*.) à 5,86 ppm (10 % chloroforme/90 % toluène). Ce déplacement vers les champs forts, pour les mélanges riches en toluène, s'explique par l'existence de complexes dans lesquels le proton du chloroforme est dans la zone de blindage du noyau aromatique.

Le solvant pour RMN le plus courant est le chloroforme deutérié (CDCl_3), suffisamment polaire pour dissoudre la plupart des composés. On utilise également l'acétone-*d*6 ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$), le méthanol-*d*4 (CD_3OD), la pyridine-*d*5 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) ou l'eau lourde (D_2O).

Lorsque le composé possède des atomes d'hydrogène mobiles, des échanges $D \leftrightarrow H$ peuvent avoir lieu avec certains solvants, ce qui entraîne des modifications d'intensité et de position des signaux correspondants. Les liaisons hydrogène modifient l'entourage électronique de certains protons, rendant parfois difficile la prévision des déplacements chimiques.

Enfin les interactions, entre molécules voisines, et la viscosité agissent également sur la résolution du spectre *via* le temps de relaxation spin/réseau.

15.12 STRUCTURE HYPERFINE – COUPLAGES SPIN-SPIN

Les spectres de RMN comportent généralement plus de signaux qu'il y a de noyaux ayant des déplacements chimiques différents. Cela est dû à ce que le champ magnétique externe dans lequel baigne tous les atomes du composé étudié provoque une orientation de tous les spins de ses noyaux et que l'orientation prise par un noyau se répercute, d'un point de vue énergétique, aux noyaux voisins par l'intermédiaire des électrons de liaison de cet atome. Ce *couplage* entre les noyaux s'atténue très vite avec la distance. Les couplages *homonucléaires* (entre noyaux de même type), ou *hétéronucléaires* (entre noyaux de types différents) se traduisent par de faibles déplacements des signaux. Cette structure hyperfine du spectre apporte des renseignements complémentaires sur le composé examiné. Le couplage homonucléaire entre protons est très fréquent, la présence de ^{13}C , ^{31}P et ^{19}F conduisant aussi à des couplages hétéronucléaires avec les protons.

■ Ce phénomène ne doit pas être confondu avec l'interaction à distance entre deux noyaux qui échangent leur aimantation quand la structure de la molécule est telle qu'ils sont proches dans l'espace, même si un grand nombre de liaisons les séparent. C'est alors l'effet Overhauser nucléaire qui se manifeste par des perturbations dans l'intensité des signaux concernés.

15.13 COUPLAGES HÉTÉRONUCLÉAIRES

15.13.1 Un couplage hétéronucléaire typique : le cas de HF

Le fluorure d'hydrogène (HF) est une molécule simple qui permet d'observer un couplage spin/spin hétéronucléaire entre ses deux atomes, séparés par une seule liaison.

Quand on examine le spectre de RMN ^1H de ce composé, on observe la présence de deux signaux d'égale intensité, alors que la molécule de fluorure d'hydrogène ne comporte qu'un seul proton (H). *À priori* il semblerait qu'on ne devrait voir qu'un seul signal. La raison est la suivante :

Quand l'échantillon de ce composé est placé dans la sonde de l'appareil, ceci revient à plonger simultanément un très grand nombre de molécules individuelles de fluorure d'hydrogène dans le champ magnétique \mathbf{B}_0 . Sachant que H et F ont chacun pour nombre de spin $I = 1/2$, les molécules se répartissent en quatre populations E_1 à E_4 , (numérotées 1 à 4) à l'état d'équilibre thermique, suivant les quatre combinaisons de spin possibles :



Figure 15.14

S'il n'y avait pas d'interaction entre les noyaux H et F, les populations $E_1 - E_2$ d'une part, et $E_3 - E_4$ d'autre part, auraient la même énergie. En RMN ^1H on ne verrait qu'une seule raie (fig. 15.14). Mais en réalité une interaction existe entre H et F. Par rapport à la situation sans couplage, un développement théorique conduit à la conclusion que les deux populations E_1 et E_2 correspondent maintenant à des états d'énergie différents : il s'ensuit qu'on observe un dédoublement de la raie supposée précédemment. Il ne faut pas fournir tout à fait la même énergie pour passer de E_2 à E_3 et de E_1 à E_3 . L'orientation de spin prise par l'atome de fluor se répercute donc sur l'énergie de la transition observée en RMN ^1H . Le spectre de ce composé comportera deux raies correspondant aux transitions repérées sur la figure 15.14.

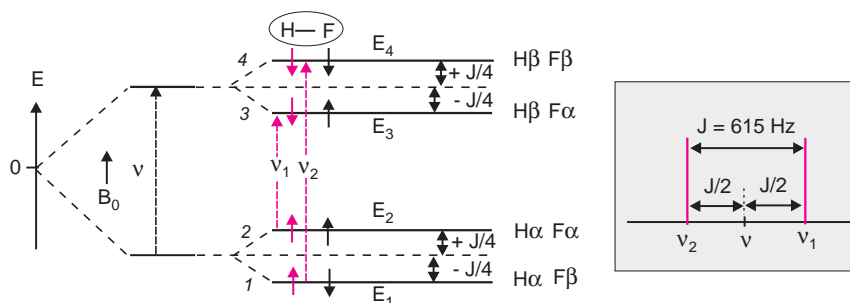


Figure 15.15 Diagramme de couplage de la molécule HF en RMN du proton. Situation de principe dans l'hypothèse où il n'y a pas de couplage avec l'atome de fluor et situation réelle. Les valeurs ν_1 et ν_2 diffèrent de la valeur de J (Hz).

Les *constantes de couplage*, exprimées en hertz sont accessibles à partir du spectre de RMN. Elles sont désignées par la lettre J avec en indice la nature des deux atomes concernés et en exposant le nombre de liaisons qui séparent ces atomes. Dans le cas étudié on écrira :

$$^1J_{\text{FH}} = 615 \text{ Hz}$$

■ Les orientations de spin du fluor, dont la fréquence de résonance est très éloignée de celle du proton, ne seront pas perturbées par la résonance des protons : dans un champ de 2,35 T, ^1H résonne à 100 MHz tandis que ^{19}F résonne à 94 MHz. Les deux raies de ^1H sont distantes de 615 Hz, quelle que soit l'intensité de \mathbf{B}_0 . Le spectre de RMN du ^{19}F de cette molécule conduirait à un spectre ayant le même aspect. On observerait également deux signaux distants de 615 Hz, dus cette fois, au couplage avec le proton suivant l'une ou l'autre des deux orientations choisies.

Lorsque le nombre de liaisons séparant les atomes concernés augmente, les couplages diminuent très vite, à moins qu'il n'existe des liaisons multiples (doubles ou triples) aptes à propager l'effet de spin par les électrons π des liaisons.

15.13.2 Couplages hétéronucléaires en chimie organique

La présence, au sein d'une molécule, d'atomes tels que ^{13}C , ^1H ou ^{19}F qui possèdent un nombre de spin de 1/2, est à l'origine de nombreux couplages hétéronucléaires, mis à profit pour faire des études de structures (fig. 15.15 et 15.16).

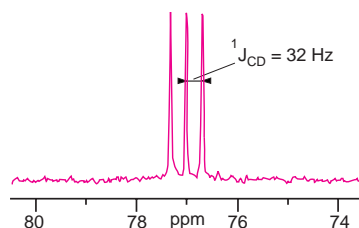


Figure 15.16 Spectre ^{13}C du CDCl_3 montrant le couplage $^1J_{\text{CD}}$.

Les trois signaux de ce spectre ont pour origine le couplage hétéronucléaire entre le ^{13}C et l'atome de deutérium ^2H (ou D), (couplage $^1J_{\text{CD}} = 32 \text{ Hz}$). Le deutérium ayant un nombre de spin de 1, il y a en effet trois possibilités pour m : -1 , 0 , $+1$, ce qui conduit au triplet. Les trois composantes sont d'égale intensité parce qu'il n'y a qu'un seul atome de deutérium. Sur pratiquement tous les spectres ^{13}C utilisant ce solvant on reconnaît ce triplet, qui se superpose au spectre du composé étudié.

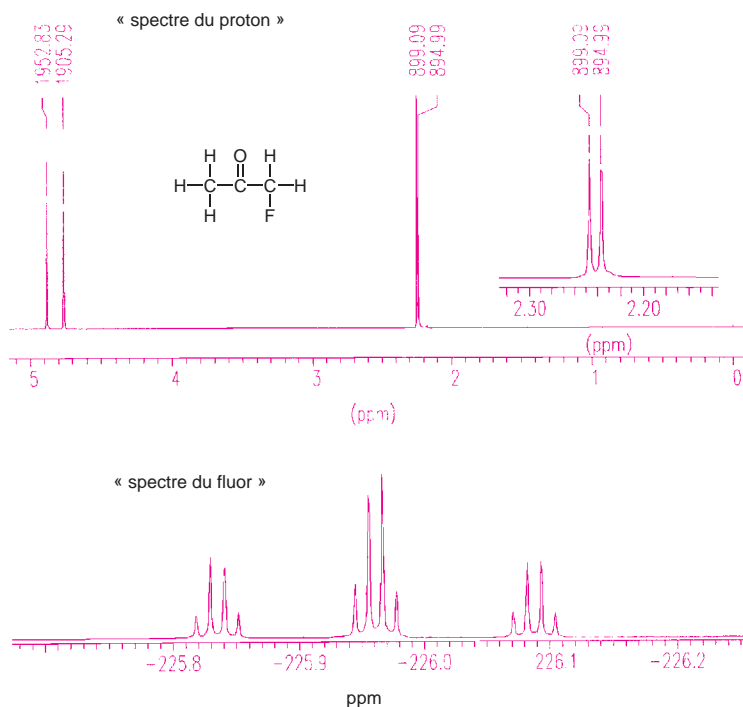


Figure 15.17 Spectres de RMN de la monofluoroacétone.

Un exemple de couplage hétéronucléaire. En haut : spectre du proton. La présence de l'atome de fluor conduit à un doublet pour le méthyle ($^4J = 4,1 \text{ Hz}$) ainsi que pour le CH_2 ($^2J = 47,5 \text{ Hz}$). En bas : spectre du ^{19}F . L'unique atome de fluor de cette molécule conduit à un triplet avec le CH_2 et à un quadruplet avec le méthyle. Le signal résultant est donc un triplet de quadruplets. En s'aidant du tableau 15.1 on pourra calculer les constantes de couplages et vérifier ainsi qu'elles sont identiques pour les 2 spectres (l'échelle des déplacements chimiques est positionnée par rapport à FSiCl_3).

15.14 COUPLAGES HOMONUCLÉAIRES

La multiplicité des signaux qui résulte de couplages hétéronucléaires est souvent observée entre des atomes voisins d'un même élément si leurs déplacements chimiques sont différents.

15.14.1 Systèmes faiblement couplés

Les noyaux sont dits faiblement couplés entre eux, quand les constantes de couplage sont beaucoup plus petites que les différences de déplacements chimiques des noyaux concernés (après conversion en Hz). Le groupement éthyle de la butanone (fig. 15.1) illustre cette situation. Le groupement éthyle (cinq protons — 3 et 2 faiblement couplés entre eux) est à l'origine des trois signaux (un *triplet*) vers 1,1 ppm et des quatre signaux (un *quadruplet*) vers 2,5 ppm. Les déplacements chimiques repérés sur le spectre permettent d'en attribuer l'origine (tabl. 15.5). Le triplet est dû au CH_3 de l'éthyle et le quadruplet au CH_2 voisin. Les intensités relatives des composantes, au sein de chacun de ces multiplets, se déduisent des lois de la statistique (fig. 15.17 et tabl. 15.4).

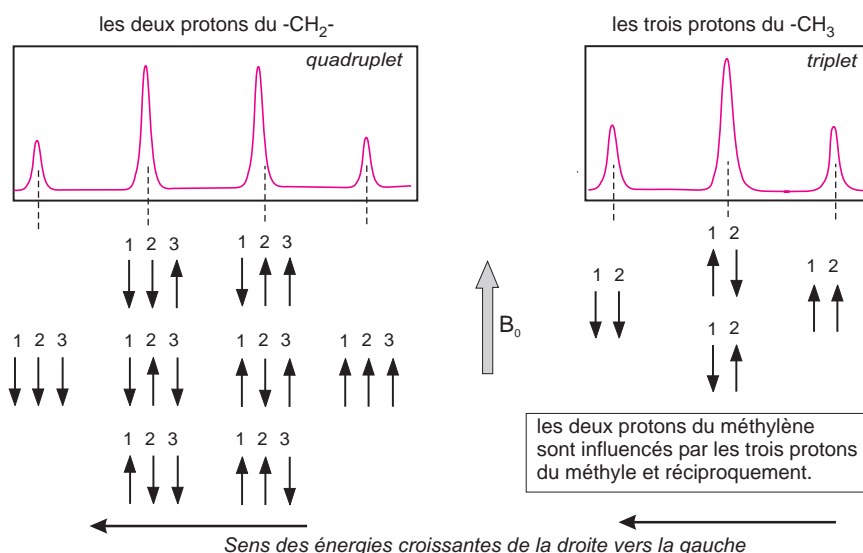


Figure 15.18 Représentation des différents états de spin des 5 protons d'un groupement éthyle. Sur une même rangée se trouvent réunies les états de spin produisant le même effet sur les noyaux voisins. L'échantillon comportant un très grand nombre de molécules identiques, celles-ci se répartissent en plusieurs populations donnant chacune un signal pondéré comme le nombre d'états par rangée de ce schéma.

En règle générale, pour les couplages faibles, si n noyaux (nombre de spin I), plongés dans le même environnement magnétique, influencent de manière identique un ou plusieurs noyaux proches, le signal de ces derniers sera formé de $2nI + 1$ signaux régulièrement espacés — $(n + 1)$ signaux dans le cas où $I = 1/2$. Les intensités sont, entre elles, comme les valeurs successives d'une même ligne du triangle de Pascal (tabl. 15.4). Mais si un groupe de protons est soumis à l'effet de noyaux voisins pour lesquels les déplacements chimiques

et les constantes de couplages ne sont pas identiques, l'approximation précédente n'est plus applicable : la multiplicité des signaux et l'intensité des raies ne peuvent se déduire aussi simplement.

■ **Nomenclature des systèmes couplés en RMN du ^1H .** L'interprétation du spectre d'une molécule comportant beaucoup d'atomes d'hydrogène est facilitée lorsqu'on peut reconnaître des sous ensembles de signaux correspondant à des situations classiques. Il est d'usage de repérer ces cas particuliers au moyen d'une nomenclature faisant appel à des lettres de l'alphabet, choisies en rapport avec le déplacement chimique (fig. 15.18). Les protons dont les déplacements chimiques sont identiques ou très proches, sont désignés par des lettres identiques ou voisines de l'alphabet (AB, ABC, A_2B_2 etc.). Les protons, dont les déplacements chimiques sont fortement différenciés, sont désignés par des lettres, telles A, M et X.

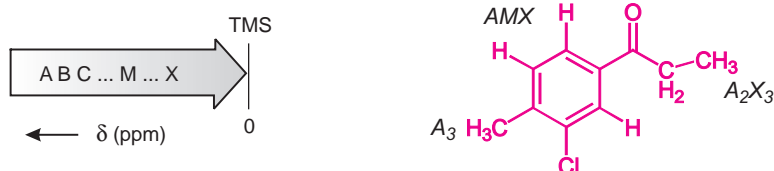


Figure 15.19 Nomenclature des spectres.

Le spectre ^1H de la 3-chloro 4-méthylpropiophénone peut être vu comme résultant de la superposition des signaux de plusieurs sous-ensembles indépendants, facilement reconnaissables. Ainsi le groupement éthyle (comme l'éthoxyle) constitue un système A_2X_3 ; les protons de l'éthanal sont un système AX_3 tandis qu'un groupe vinyle sera un système ABC, AMX ou ABX suivant l'exemple étudié.

Tableau 15.4 Triangle de Pascal et son application à la RMN pour $I = 1/2$.

Hydrogènes voisins	multiplicité	Intensité
0	singulet	1
1	douplet	1 1
2	triplet	1 2 1
3	quadruplet	1 3 3 1
4	quintuplet	1 4 6 4 1
5	sextuplet	1 5 10 10 5 1
6	septuplet	1 6 15 20 15 6 1

■ En RMN ^{13}C , les constantes de couplage $^1J_{\text{C-H}}$ étant de l'ordre de 125 à 200 Hz, il se produit souvent des chevauchements de signaux qui rendent le spectre moins lisible. Il est possible techniquement d'éliminer l'ensemble des couplages d'avec tous les protons (fig. 15.19).

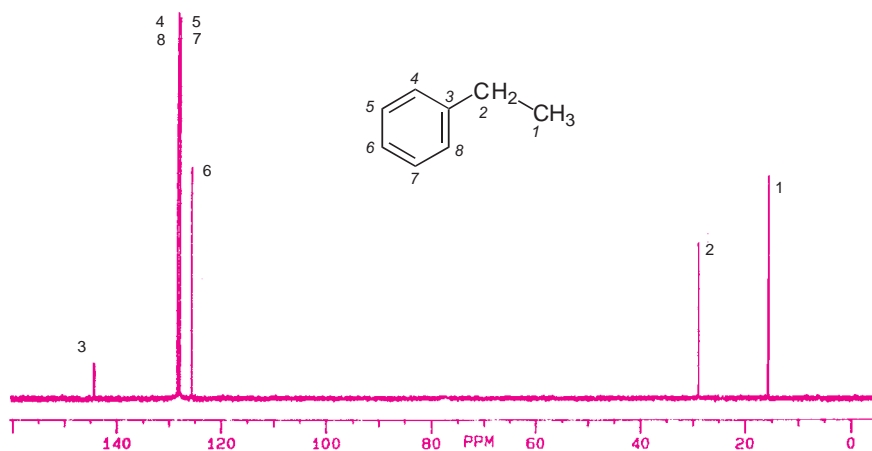


Figure 15.20 Spectre du ^{13}C de l'éthylbenzène découplé des protons. Chaque atome de carbone donne un seul signal, chaque carbone étant alors représenté par un singlet. Ces spectres découplés « large bande », plus simples, donnent moins d'informations.

15.14.2 Systèmes fortement couplés

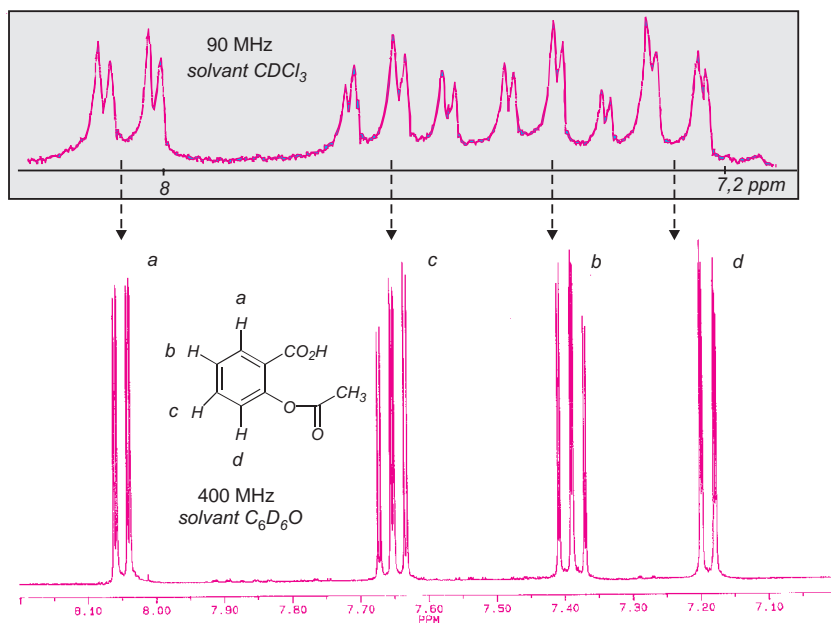


Figure 15.21 Spectres des 4 protons aromatiques de l'aspirine. La figure reproduit le spectre d'un échantillon d'aspirine, obtenu sur deux appareils, l'un fonctionnant à 90 (solvant CDCl_3) et l'autre à 400 MHz (solvant $\text{C}_6\text{D}_6\text{O}$). La sensibilité de la RMN croît comme $B_0^{3/2}$.

Lorsque le rapport $\Delta\nu/J$ est petit, les protons deviennent fortement couplés. Les intensités des multiplets sont alors très perturbées. Il apparaît de nouvelles raies dites de combinaison qui rendent plus difficiles l'interprétation des spectres correspondants. C'est une des raisons du développement des appareils fonctionnant à des fréquences élevées (300 \rightarrow 750 MHz), utilisant les aimants supraconducteurs pour obtenir les champs magnétiques nécessaires. Etant donné que $\Delta\nu$ est proportionnel à la fréquence propre de l'appareil, alors que J demeure constant, les rapports $\Delta\nu/J$ augmentent et on observe à nouveau des systèmes faiblement couplés (fig. 15.20). Cependant d'autres phénomènes viennent compliquer les spectres lorsque la fréquence dépasse 600 MHz.

■ **Le système AB.** Quand la différence de fréquence de résonance entre deux protons est comparable à leur constante de couplage J , on se trouve en présence du plus simple des systèmes fortement couplés. Ce système comporte toujours deux groupes de 2 signaux, ces derniers séparés de J Hz, mais les intensités ne sont plus égales et les déplacements chimiques, qui ne peuvent plus être lus sur le spectre, doivent être calculés à partir des relations indiquées sur la figure 15.21.

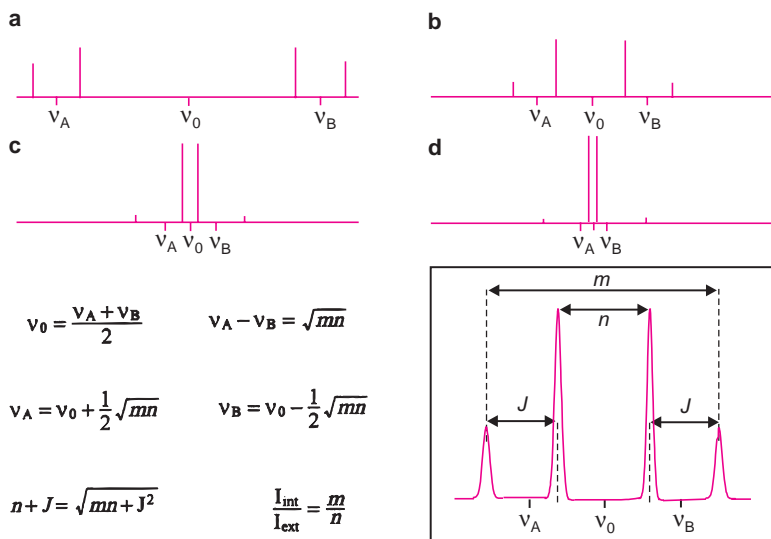


Figure 15.22 Caractéristiques définissant un système AB.

a-d) Modification graduelle d'un système de deux protons couplés, à mesure que la valeur du rapport $\Delta\nu/J$ diminue. Aspect typique et formules utilisées pour l'analyse d'un système AB.

15.15 DÉCOUPLAGE DE SPIN ET SÉQUENCES PARTICULIÈRES

Les appareils de RMN disposent de nombreux perfectionnements pour faciliter l'interprétation des spectres. C'est ainsi qu'il est possible d'annuler l'effet d'un couplage existant entre noyaux voisins. Ce *découplage de spin* repose sur le fait qu'un noyau en état de résonance ne conserve pas le même état de spin au cours du temps. Il est en quelque sorte débousolé ! Son basculement ininterrompu et surtout très rapide entre ses différents états induit un effet global moyen sur les noyaux voisins.

Dans la pratique, pour mener à bien une expérience de découplage de spin, on commence par enregistrer le spectre dans les conditions normales. Ensuite, on ré-enregistre le spectre tout en irradiant à la fréquence de résonance du (ou des) noyau(x) que l'on veut découpler, à l'aide d'un second émetteur de radiofréquence ajustable (fig. 15.22). On utilise cette technique de double résonance pour identifier les noyaux couplés lorsque l'interprétation du spectre normal ne semble pas évidente, en particulier s'il fait apparaître une superposition de signaux.

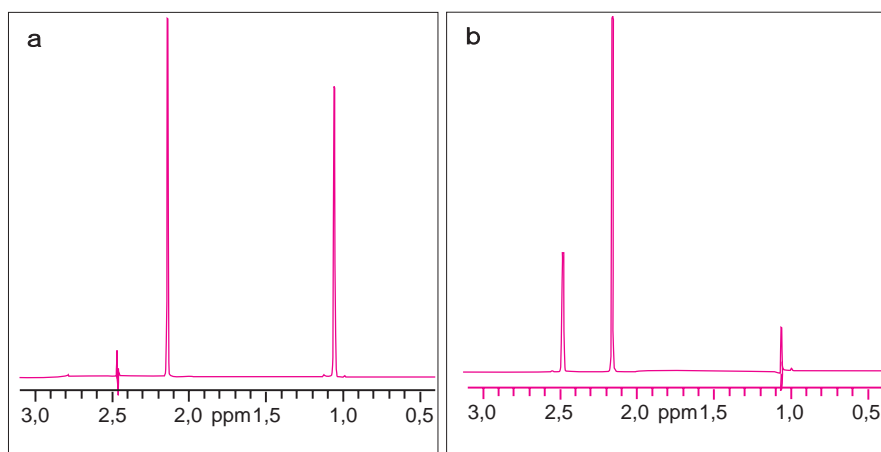


Figure 15.23 Expérience de découplage de spin sur la butanone.

Modification du spectre du proton (^1H) par : a) irradiation du CH_2 à 2,47 ppm ; b) irradiation du CH_3 (de l'éthyle) à 1,07 ppm. Comparer avec l'enregistrement de la butanone (fig. 15.1). Pour un composé simple tel que celui-ci, ce type d'expérience n'a qu'un intérêt illustratif. Par contre une expérience de double résonance permettrait de déterminer avec précision les différents couplages de l'aspirine (fig. 15.20).

La RMN par transformée de Fourier à hauts champs ($B_0 = 17,6 \text{ T}$ pour l'étude du ^1H à 750 MHz) a considérablement étendu les possibilités de la méthode grâce à la vitesse d'acquisition et de calcul des spectres. Parmi les possibilités classiques, on trouve la spectroscopie multidimensionnelle (RMN 2D ou 3D) et de nombreuses expériences qui reposent sur l'envoi de séquences particulières d'impulsions, grâce auxquelles on peut accéder aux temps de relaxation des noyaux, résoudre les problèmes liés à des superpositions de signaux et déduire de nombreux renseignements structuraux. Pour les biopolymères, la RMN bi- et tridimensionnelle conduit à des résultats comparables à ceux de la radiocristallographie ; elle permet, en outre, d'accéder à la conformation des molécules dans leur milieu naturel.

■ **Imagerie de résonance magnétique (IRM).** La RMN du proton peut être exploitée pour obtenir des images de tout matériau contenant des atomes d'hydrogène, depuis les organismes vivants jusqu'aux couches géologiques. Cet important développement de la RMN, dont le pionnier a été R. Ernst, prix Nobel de chimie en 1991, est appliqué au domaine médical, sous le nom d'IRM. Il s'agit d'une technique qui permet un examen non traumatique, adapté aux tissus mous sans avoir à y pénétrer. Le volume examiné doit être placé dans le champ magnétique, ce qui exige la fabrication de très gros aimants supraconducteurs pour les appareils dits corps entier. Le signal des protons de l'eau est le plus facile à observer car les tissus biologiques en contiennent environ 90 % (un individu de 70 kg comporte 50 kg

d'eau et 13 kg de carbone). Dans d'autres cas on repère le signal des CH₂ des tissus gras-seux. L'image finale est une présentation cartographique de la répartition en intensité d'un même type de signal, le contraste étant relié aux variations des temps de relaxation des protons dans le plan choisi. Parmi les difficultés techniques spécifiques à cette méthode de RMN tridimensionnelle, figure la focalisation (ou sélectivité spatiale) c'est-à-dire l'obtention du signal issu d'un volume quasi ponctuel à l'intérieur d'un objet.

15.16 COUPLAGE CLHP/RMN

Le couplage CLHP/RMN constitue un challenge quand on sait que la tendance à la miniaturisation de la CLHP s'accompagne d'une diminution des quantités chromatographiées et que la détection des signaux de résonance est peu sensible. Pendant longtemps on a donc cru impossible la réalisation de méthodes couplées en tandem avec la RMN. L'enjeu est cependant important principalement en recherche, la RMN étant la technique qui apporte le plus d'informations structurales sur les composés organiques.

Les appareils ont fait maintenant suffisamment de progrès pour que le couplage CLHP/RMN du proton devienne une réalité (fig. 15.23).

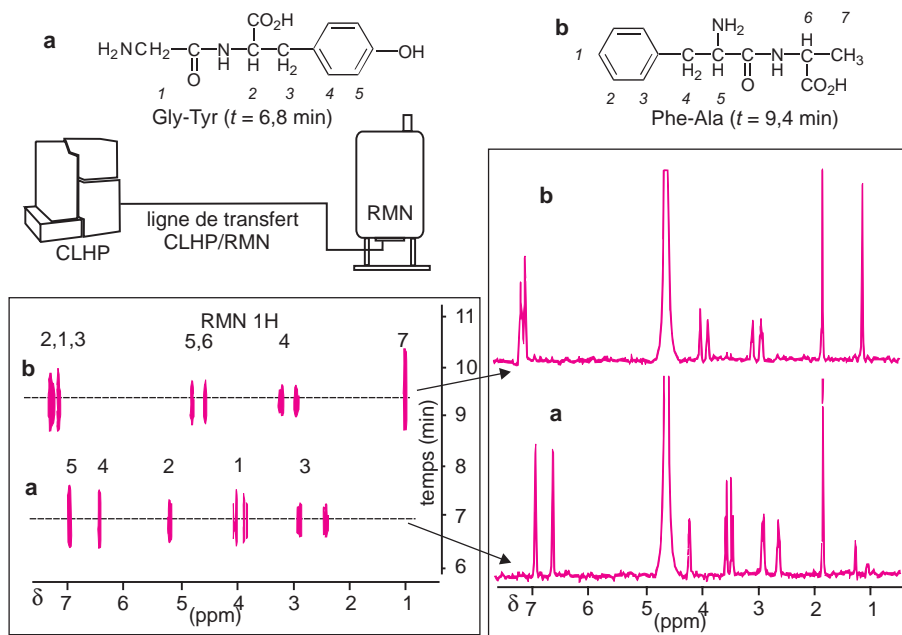


Figure 15.24 Enregistrement obtenu au cours d'une expérience CLHP couplée à une détection par RMN¹H.

Séparation de deux dipeptides (5 µg chacun) avec identification des signaux. Pour plus de clarté, les pics des solvants vers 2 et 5 ppm (acétonitrile et eau) ont été éliminés (selon Sweeder et al., *Analyt. Chem.*, 1999, 71(23), 5335).

Le principe consiste à faire passer la phase mobile après sortie du détecteur du chromatographe dans une micro-cellule à circulation placée dans l'appareil de RMN. Sans interrompre le débit (technique *on-flow*) on enregistre au cours du temps un grand nombre de

spectres de RMN qu'il est possible ensuite d'étudier pour reconnaître la nature des composés élués. Cependant si la quantité de composé est trop faible il faut pouvoir interrompre momentanément le débit de la phase mobile (technique *stop-flow*) afin d'accumuler des centaines de balayages (*scans*) pour accroître le rapport signal/bruit du spectre correspondant.

15.17 RMN DU FLUOR ET DU PHOSPHORE

Le fluor et le phosphore sont les deux hétéroatomes, au sens de la chimie organique, qui ont été le plus étudiés par RMN après l'hydrogène et le carbone.

L'élément fluor, constitué par 100 % de ^{19}F ($I = 1/2$), est à comparer au proton ^1H pour sa bonne sensibilité. Son électronégativité étant supérieure à ce dernier (4 au lieu de 2,1), l'étendue des déplacements chimiques est beaucoup plus grande (fig. 15.24). Par conséquent, en RMN ^{19}F , il devient possible de distinguer des composés chimiquement très semblables. En particulier, les différences dues à la stéréochimie des molécules étudiées sont importantes et les constantes de couplage $J_{\text{F-H}}$ peuvent se mesurer sur de plus grandes distances que les $J_{\text{H-H}}$ (fig. 15.15).

En revanche, relativement peu de molécules contiennent des atomes de fluor. Les spectres de RMN du fluor sont donc généralement obtenus sur des composés dans lesquels on a volontairement introduit par modification chimique cet atome (ou un groupement CF_3) en une position connue, afin de déduire des renseignements structuraux à partir des perturbations apparues. L'atome de fluor provoque un déplacement chimique comparable à celui d'un groupement OH mais peu de modifications stériques dans la molécule car les rayons de Van der Waals sont comparables : 1,35 au lieu de 1,1 Angström pour l'atome d'hydrogène.

Le phosphore (^{31}P , $I = 1/2$) autre élément commun dont un seul isotope existe à l'état naturel, a été étudié depuis l'origine de la RMN, tant parce que sa sensibilité est grande et qu'il rentre dans la composition de nombreux composés importants en biologie.

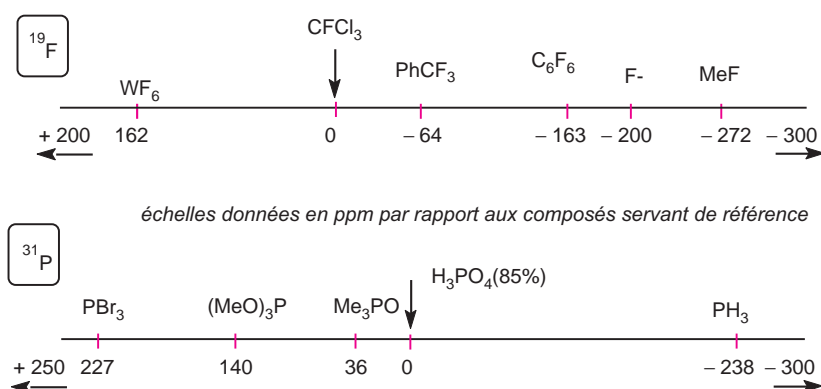


Figure 15.25 Positions de quelques signaux en RMN du fluor et du phosphore.

15.18 RMN QUANTITATIVE

Bien que la RMN soit une méthode réservée au domaine de l'analyse structurale, par la qualité des renseignements qu'elle apporte, elle sert accessoirement à étudier la composition de mélanges. Cette application est possible si les signaux choisis pour repérer chaque constituant ont des aires qui peuvent être mesurées séparément. La sensibilité et la précision varient suivant le type de noyau, mais la méthode est intéressante dans la mesure où il est possible de faire des analyses sans préparation compliquée ni destruction de l'échantillon, sans risque de pollution de l'appareil et à la différence de beaucoup d'autres méthodes, telle la chromatographie, sans procéder à une étape de normalisation préalable.

En synthèse organique, la RMN du proton permet de calculer les rendements des réactions effectuées. Enfin l'industrie utilise des analyseurs « basse résolution » basés sur la RMN du proton ^1H pour effectuer de nombreux dosages de l'eau et des matières grasses dans le domaine de l'analyse agroalimentaire, le médical et l'industrie des polymères.

15.18.1 Mesure des aires – application à un dosage simple

Les aires des signaux des spectres peuvent être données sous forme de valeurs numériques ou, pour les appareils plus anciens, à partir de la courbe d'intégration tracée en superposition du spectre (fig. 15.1). Pour le proton la précision des aires ne dépasse pas 1 %, même en prenant soin d'utiliser, avec les appareils à onde continue, une vitesse de balayage assez lente. En RMN ^{13}C , il est préférable d'ajouter un agent de relaxation, pour éviter le phénomène de saturation, lié aux temps de relaxation, qui altère les intensités des signaux. À partir des rapports molaires auxquels l'examen du spectre permet un accès quasi immédiat, il est possible de passer aux concentrations massiques.

Considérons un échantillon constitué d'un mélange d'acétone A et de benzène B dilué dans CDCl_3 comme solvant. On observe sur le spectre RMN ^1H de ce mélange deux signaux à $\delta = 2,1$ ppm (acétone) et à $\delta = 7,3$ ppm (benzène), par rapport au TMS. Ce spectre correspond à la superposition pondérée des deux spectres individuels (fig. 15.25).

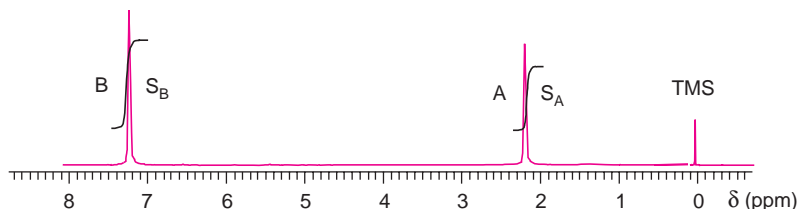


Figure 15.26 Spectre de RMN ^1H d'un mélange d'acétone (A) et de benzène (B). Si $S_A = 111$ et $S_B = 153$ (unités arbitraires), on trouvera, sachant que $M_A = 58$ et $M_B = 78 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, $C_A = 35 \%$ et $C_B = 65 \%$ en masse.

Dans ce cas particulier où les molécules des deux composés ont chacune six protons, le rapport des aires des deux signaux est représentatif du rapport n_A/n_B des nombres respectifs de molécules de A et de B (on admettra que les facteurs de réponse sont égaux pour A et B).

En désignant par S_A l'aire du signal de l'acétone et par S_B celle du benzène, on aura :

$$\frac{n_A}{n_B} = \frac{S_A}{S_B} \quad (15.11)$$

En appelant C_A et C_B les concentrations exprimées en pourcentages massiques de A et de B, dont les masses molaires sont M_A et M_B , et sachant que ce mélange ne contient que ces deux constituants, on écrira :

$$C_A + C_B = 100$$

et

$$\frac{C_A}{C_B} = \frac{n_A \cdot M_A}{n_B \cdot M_B} \quad (15.12)$$

ou, en faisant intervenir la relation 15.11 :

$$\frac{C_A}{C_B} = \frac{S_A \cdot M_A}{S_B \cdot M_B} \quad (15.13)$$

soit, après calculs,

$$C_A = 100 \cdot \frac{S_A M_A}{S_A M_A + S_B M_B} \quad \text{et} \quad C_B = 100 \cdot \frac{S_B M_B}{S_A M_A + S_B M_B} \quad (15.14)$$

15.18.2 Échantillons constitués de composés identifiables

Un cas plus général est celui où le signal (ou les signaux) sélectionné(s) pour chaque composé à doser ne correspond pas globalement au même nombre de protons, soit parce que les molécules n'ont pas le même nombre total de protons, soit parce que seule une partie du spectre de chaque composé a été choisie pour l'identifier.

Supposons, par exemple, que le signal sélectionné pour un composé A corresponde à a protons et le signal choisi pour un composé B, à b protons (A et B ne représentant plus l'acétone et le benzène comme ci-dessus). Quand on enregistre le spectre d'un mélange de A et de B, chaque petite molécule vraie de B conduit à une réponse dont l'intensité est différente de celle d'une molécule de A. Les relations 15.14 resteront valables à condition d'en tenir compte. On divisera donc chaque aire sélectionnée par le nombre de protons qui en est à l'origine, afin de normaliser les aires à celles d'un seul proton, pour A ou pour B. En remplaçant S_A et S_B par les aires ainsi corrigées, S_A/a et S_B/b , les deux expressions précédentes restent valables et deviennent :

$$C_A = 100 \cdot \frac{\frac{S_A}{a} M_A}{\frac{S_A}{a} M_A + \frac{S_B}{b} M_B} \quad \text{et} \quad C_B = 100 \cdot \frac{\frac{S_B}{b} M_B}{\frac{S_A}{a} M_A + \frac{S_B}{b} M_B} \quad (15.15)$$

La formule 15.15 peut être adaptée au cas d'un nombre quelconque de constituants visibles sur le spectre. En utilisant les descripteurs tels A, B,...Z, et en repérant chaque constituant par une aire spécifique S_i de i protons pour le constituant I , on aboutit à la relation générale 15.16 donnant le % massique de chacun d'eux :

$$C_I = 100 \cdot \frac{(S_I/i) \cdot M_I}{(S_A/a) \cdot M_A + (S_B/b) \cdot M_B + \dots + (S_I/i) \cdot M_I + \dots + (S_Z/z) \cdot M_Z} \quad (15.16)$$

En relation avec ce type de calcul, la RMN ^1H sert fréquemment, en chimie organique, de méthode pour établir le rendement d'une réaction $A \rightarrow B$. Pour cela on identifie, sur le spectre du produit brut, après réaction, un signal appartenant au produit formé (B) et un signal appartenant au reste de produit de départ (A). Le rendement de B par rapport à A s'écrit, avec les notations précédentes :

$$R = 100 \cdot \left(\frac{S_B}{b} \right) / \left(\frac{S_A}{a} + \frac{S_B}{b} \right) \quad (15.17)$$

15.18.3 Méthode du standard interne

En RMN, il n'est pas indispensable pour quantifier un composé dans un mélange, de connaître la nature de tous ceux qui sont présents ou d'identifier *tous* les signaux du spectre. Il suffit, en effet, de repérer un signal appartenant au composé auquel on s'intéresse.

Souvent il s'agit de calculer la concentration d'un seul composé dans un échantillon.

Supposons qu'on veuille doser le composé X ($M = M_X$) dans un échantillon E. Avant d'enregistrer le spectre on prélève P_E mg de cet échantillon contenant le produit X , auquel on ajoute une quantité de p_R mg du composé R ($M = M_R$), à usage de référence interne. Ce composé est choisi de manière que le signal servant d'indicateur, n'interfère pas avec le signal choisi pour le composé X (fig. 15.26). Ensuite on repère sur le spectre de RMN du mélange contenant la référence interne :

- un signal appartenant au composé X (aire S_X pour x protons),
- un signal appartenant au standard R (aire S_R pour r protons).

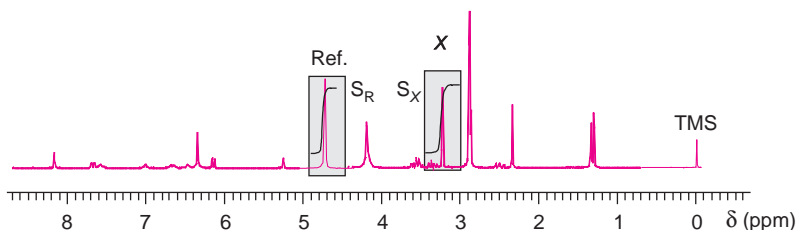


Figure 15.27 Schéma représentant l'aspect du spectre

d'un échantillon auquel on a ajouté un composé de référence R.

Le signal X appartient au composé à doser et le signal Ref., au standard interne.

En désignant par n_X/n_R le rapport molaire de X et de R , on écrira comme précédemment :

$$\frac{C_X}{C_R} = \frac{n_X}{n_R} \cdot \frac{M_X}{M_R} \quad (15.18)$$

Sachant que :

$$\frac{n_X}{n_R} = \frac{S_X/x}{S_R/r} \quad (15.19)$$

Considérant que la concentration C_R , exprimée en % massique de R , est égale à :

$$C_R = 100 \cdot \frac{p_R}{P_E + p_R} \quad (15.20)$$

on en déduira la concentration en % massique de X, soit C_X :

$$C_X = 100 \cdot \frac{p_R}{P_E + p_R} \cdot \frac{(S_X/x) \cdot M_X}{(S_R/r) \cdot M_R} \quad (15.21)$$

15.18.4 Méthode d'ajout

Cette dernière méthode peut être améliorée en faisant plusieurs solutions étalons contenant à la fois l'échantillon et des quantités croissantes du composé à doser. A partir des spectres de RMN correspondants à ces solutions, on trace la droite de régression simple représentant l'aire du signal sélectionné pour le dosage, en fonction de la quantité ajoutée, portée sur l'axe des abscisses. L'intersection de la droite avec cet axe conduit à la concentration cherchée (fig. 15.27).

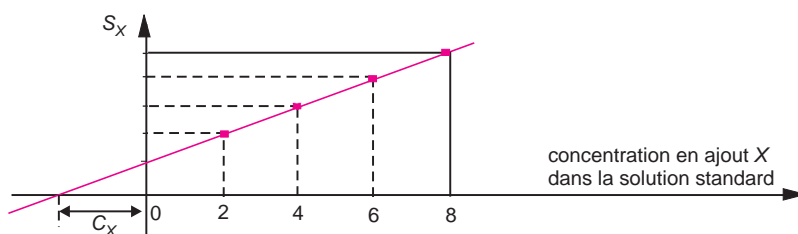


Figure 15.28 Tracé obtenu par la méthode d'ajout en RMN.

La concentration cherchée correspond au segment d'abscisse délimité entre l'origine des axes et l'intersection avec la droite d'étalonnage.

La difficulté de cette méthode est de maintenir la stabilité et la sensibilité de l'appareil de RMN pendant tout le temps nécessaire à la réalisation des enregistrements successifs.

15.19 ANALYSEURS UTILISANT LA RMN IMPULSIONNELLE

La RMN à transformée de Fourier, à onde pulsée, permet également une autre forme de dosage de routine encore sous-estimée par les analystes de contrôle-qualité. Ainsi l'eau et quelques composés organiques, dont les matières grasses, peuvent-ils être dosés par cette technique à partir de la concentration en élément hydrogène de l'échantillon. Les instruments correspondants ne permettent pas de tracer le spectre habituel mais mesurent l'intensité globale du FID sitôt après la période d'irradiation, ainsi que sa décroissance dans le temps (fig. 15.28 et 15.29). La vitesse avec laquelle les protons se relaxent renseigne sur l'environnement des atomes d'hydrogène. Il devient donc possible de distinguer les protons engagés dans un composé solide, de ceux qui, au contraire, font partie d'un liquide.

Dans le domaine agroalimentaire on peut ainsi déterminer, après étalonnage, la concentration des constituants majeurs, eau et corps gras, d'échantillons divers.

Suivant le même principe, d'autres applications existent basées sur la détection des éléments phosphore ou fluor.

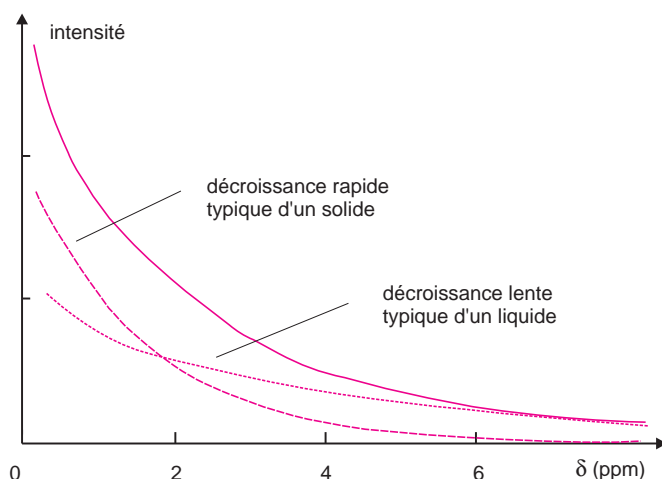


Figure 15.29 Décroissance du FID d'un mélange solide/liquide.

On distingue la mesure absolue de l'amplitude du FID qui renseigne sur la quantité de protons exprimée en pourcentage de la masse totale, et les mesures relatives basées sur T_2 qui permettent de déterminer le pourcentage de solide dans un échantillon par décomposition de la courbe enveloppe en ses composantes.

■ Pour déterminer les ressources en eau du sous-sol (épaisseur et profondeur des nappes aquifères), les géologues peuvent se baser sur le signal de RMN des protons soumis au très faible champ magnétique terrestre en utilisant un matériel adapté (la fréquence de Larmor est de quelques centaines d'hertz).

Il est peu probable que le don des sourciers réside dans la détection d'un tel signal !



Figure 15.30 Appareil de RMN ^1H basse résolution destiné aux analyses de routine. Analyseur fonctionnant sur le principe de la RMN impulsionnelle, utilisé pour quantifier l'eau et les matières grasses de nombreux produits agroalimentaires (modèle Minispec, reproduit avec l'autorisation de la société Bruker).



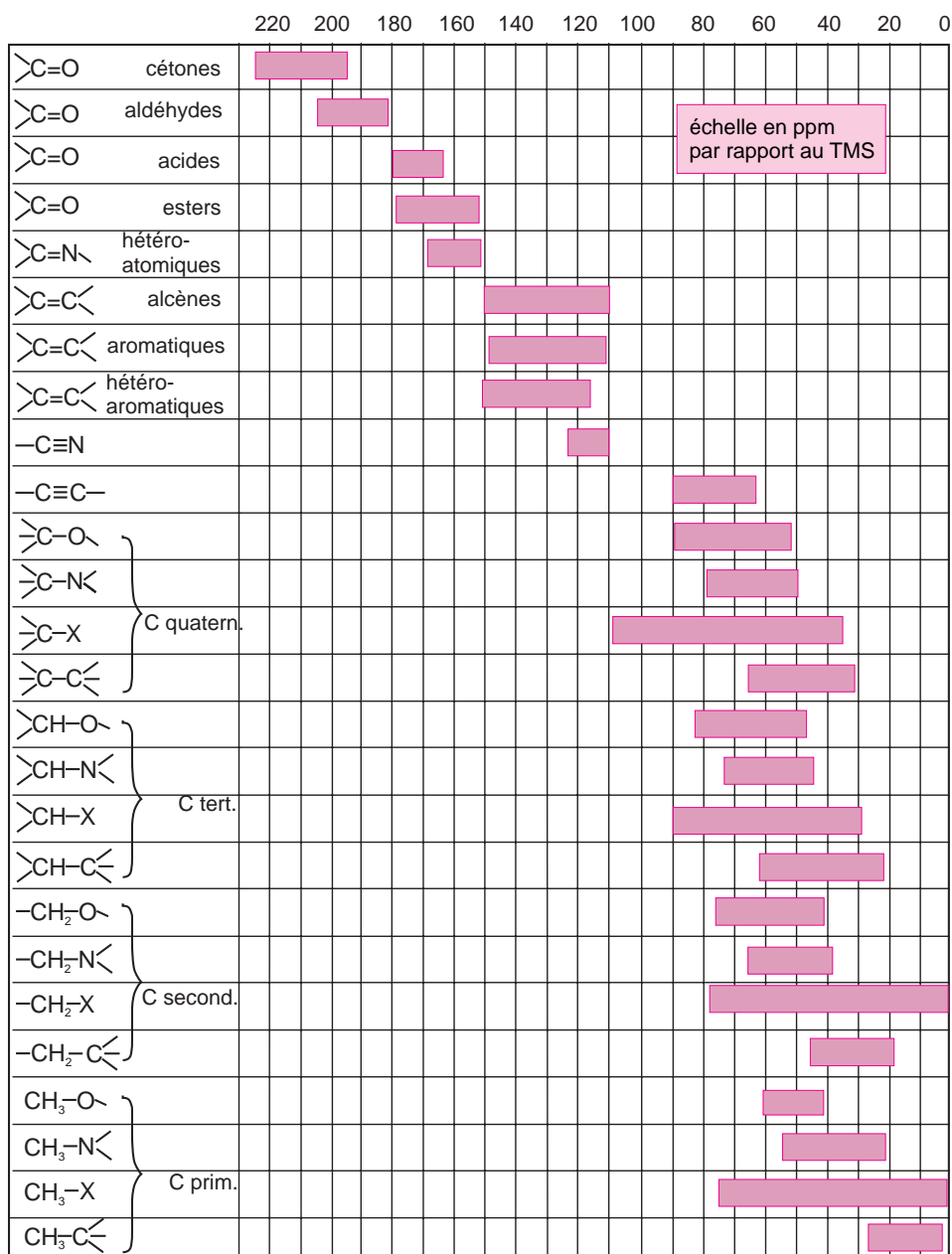
Figure 15.31 Échantillons et aimants des appareils de RMN.

À gauche, introduction robotisée d'un échantillon en solution, placé dans un « tube de RMN », au sein du champ magnétique produit par une bobine supraconductrice maintenue à la température de l'hélium liquide (reproduit avec l'autorisation de la société Bruker) ; à droite, un électroaimant de grande taille prévu pour l'introduction d'un type très particulier d'échantillon : le corps humain (partie d'un appareil d'imagerie de résonance magnétique de la société SMIS).



Figure 15.32 Appareil de RMN de recherche.

L'aspect caractéristique de ces instruments apparaît sur cette photographie où sont réunis un aimant de type supraconducteur (au fond), une armoire contenant l'informa-tique nécessaire et l'électronique de commande et un poste de travail pour l'exploita-tion des résultats. Modèle Avance 500 MHz (reproduit avec l'autorisation de la société Bruker).

Tableau 15.6 Table de corrélation des fonctions organiques en RMN ^{13}C 

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.bruker.fr
www.hitachi.com

www.jeol.com
www.varianinc.com

www.resonance.com
www.cis.rit.edu/htbooks/nmr

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 15.1

Les tables des nucléides reportent souvent la valeur de la projection de leur moment magnétique nucléaire sur un axe parallèle à B . Ainsi pour le proton, $\mu_z = 1,41 \times 10^{-26} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$.

Retrouver la constante γ du proton.

Exercice 15.2

Calculer, pour $T = 300 \text{ K}$, le rapport des populations N_{E1}/N_{E2} pour le proton dans un appareil dont le champ d'induction magnétique $B = 1,4 \text{ T}$. Effectuer ce même calcul pour un champ $B = 7 \text{ T}$.

On donne : $\gamma = 2,6752 \times 10^8 \text{ rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

Exercice 15.3

Sur un spectre de RMN¹H, 1 ppm est représenté par un intervalle de 4 cm en abscisse avec un appareil à 200 MHz.

- a) Quelle distance existe-t-il entre 2 signaux qui diffèrent de 7 Hz ?
- b) Sachant que $\gamma_{\text{H}}/\gamma_{\text{C}} = 3,98$, que devient cette distance pour un spectre du ¹³C enregistré avec cet appareil ?

Exercice 15.4

- a) Calculer le déplacement chimique δ en ppm d'un proton dont le signal de RMN est décalé de 220 Hz par rapport au TMS (le champ d'induction magnétique du spectromètre est de 1,879 T).
- b) Le signal de résonance pour un proton est décalé de 90 Hz par rapport au TMS lorsqu'il est mesuré avec un appareil à 60 MHz. Que deviendrait ce décalage avec un appareil à 200 MHz ?
- c) Quels seraient les déplacements chimiques (δ , ppm) correspondants de ce proton avec l'un et l'autre de ces appareils ?

Exercice 15.5

Sachant que le rapport des constantes magnétogyriques $\gamma_{\text{F}}/\gamma_{\text{H}}$ est de 0,9413, calculer la distance qui séparerait le TMS d'un signal dû à un atome de fluor. On choisira pour échelle 1 ppm = 2 cm sur le spectre (spectromètre ¹H, 200 MHz).

Exercice 15.6

On dispose de deux isomères A et B de même formule brute $C_2HCl_3F_2$.

Le spectre RMN¹H (appareil 60 MHz) de A présente un doublet de doublets à 6,2 ppm ($J = 70$ Hz et $J = 7$ Hz) et celui de B, 1 triplet à 5,9 ppm ($J = 70$ Hz).

- a) Quelle est la structure de chacun de ces isomères ?
- b) Un troisième isomère est possible. Décrire quel devrait être son spectre dans ces conditions.

Exercice 15.7

Retrouver la masse molaire de l'aldéhyde salicylique à partir des données suivantes :

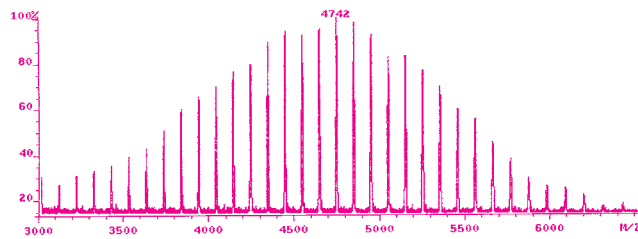
Après avoir ajouté 25 mg de vanilline ($C_8H_8O_3$) à 20 mg d'aldéhyde salicylique, on enregistre le spectre de RMN¹H du mélange.

On remarque, sur la courbe d'intégration, associée au spectre de RMN¹H de ce mélange, que les hauteurs des paliers correspondant au proton aldéhydique de la vanilline et à celui de l'aldéhyde salicylique sont chacune sensiblement égales à 20 mm.

Données : H = 1, C = 12 et O = 16 g·mol⁻¹.

PARTIE 3

Autres méthodes



LES ANALYSES DE TRACES ET ULTRA-TRACES

*L'analyse chimique moderne utilise des instruments de plus en plus sensibles. Plus de la moitié des analyses concerne des analytes à des concentrations très faibles, dites à l'état de **trace** et d'**ultra-trace**.*

La notion de trace est en relation avec les concentrations massiques correspondantes. Par convention, un composé est dit à l'état de trace dans un échantillon lorsqu'il est présent à une concentration inférieure à 1 000 ppm. Au-dessous du mg/L ou du mg/kg, un analyte est considéré comme étant à l'état d'ultra-trace.

Dans les faits, ces frontières ne sont pas toujours aussi nettes. Elles dépendent de l'analyte et de l'usage de la matière analysée. Ces deux termes reçoivent quelquefois une interprétation plus subjective : si un échantillon d'acétone à usage de solvant, contient 0,1 % de méthanol, on dira que ce dernier est à l'état de trace (1 000 ppm), mais s'il s'agit d'une eau de consommation, on considérera qu'il y en a une grande quantité.

Pour effectuer ces analyses, on utilise des appareils dont il faut connaître la limite de détection. Celle-ci est définie par la concentration de l'analyte qui permet d'obtenir un signal détectable avec certitude — par exemple 3 fois l'écart-type du signal du bruit de fond ou du « blanc ». Elle s'exprime en parties par million (la ppm est définie en masse/masse ou masse/volume selon le milieu dans lequel se trouve l'analyte). Si la masse ou le volume de solution utilisé par l'appareil et nécessaire à l'obtention de ce résultat est bien défini, la valeur précédente peut être transformée en quantité absolue d'analyte exprimée en masse ou en fraction molaire (pico, femtomole, etc.) pour obtenir ce signal. En général ces valeurs sont excessivement petites, car les appareils actuels se contentent d'un volume d'échantillon très faible.

À titre d'exemple, si on injecte dans un chromatographe 1 μL d'une solution à 1 ppb d'un analyte (soit 1 pg), et si la mole pèse 100 g, cela fera 10 femtomoles ! On doit dorénavant s'habituer à ces préfixes peu courants de femto- (10^{-15}), atto- (10^{-18}), zepto- (10^{-21}). Ainsi une zeptomole ne contient que 602 molécules vraies. On s'approche donc de l'atome ou de la molécule individuelle — la trace ultime.

La détection des espèces individuelles est possible avec certaines méthodes. Les isotopes radioactifs nous ont habitués à repérer un seul atome, ce qui ne veut pas dire pour autant que la sensibilité des méthodes basées sur les comptages d'isotopes radioactifs soit toujours meilleure que celle des méthodes utilisant des isotopes stables. Ce paradoxe s'explique en considérant que, pour repérer par comptage un atome radioactif, il faut qu'il se décompose pendant le temps de la mesure. Or, si la période du radio-élément est longue, on aura très peu de chance d'assister à cet événement.

La fluorescence, la SM sont d'autres voies également utilisées pour détecter le signal envoyé par une molécule vraie. Si la plupart des analyses de traces se font à partir des mêmes méthodes que pour doser les composés plus abondants, elles exigent, par contre, beaucoup de soin. Plus on traque les ultra-traces, plus les difficultés surgissent. Les réactifs deviennent « pollués », il faut travailler en salle blanche... En l'absence de toutes ces précautions, on pourra trouver n'importe quoi n'importe où — il suffira de se fixer le choix de l'espèce à trouver.

Chapitre 16

Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse (SM) désigne une méthode de caractérisation de la matière qui repose sur la détermination des masses atomiques ou moléculaires des espèces individuelles présentes dans l'échantillon. Les instruments correspondants sont les spectromètres de masse qui se répartissent en cinq catégories suivant leur conception. Certains dérivent des montages mis au point au début du siècle pour l'étude des particules ou des atomes ionisés soumis à un champ magnétique, tandis que d'autres font appel aux seuls champs électriques tels les « bench-top » souvent placés en aval d'une technique séparative (chromatographie par exemple). Les perfectionnements de ces appareils, leur miniaturisation ainsi que l'apparition de nouvelles techniques d'ionisation, ont fait de cette méthode celle qui a le plus vaste champ d'application par sa polyvalence et par son extrême sensibilité. Elle est présente dans des secteurs très divers : chimie organique et inorganique, biochimie, chimie clinique et environnementale, géochimie. Elle sert à toutes sortes d'analyses dans le but de déterminer la nature, la composition et même la structure éventuellement d'échantillons divers pour le respect des réglementations et dans l'industrie en général.

16.1 PRINCIPE DE BASE

La spectrométrie de masse est basée sur la détermination des masses des molécules ou atomes présents dans l'échantillon étudié. Pour arriver à ce résultat, on commence par transformer une très petite quantité du composé à analyser en ions par un moyen adapté (bombardement avec des électrons, des atomes, des photons...). Ces ions sont alors soumis, sous un très bon vide, à l'action d'un champ électrique et /ou magnétique selon les cas. Les forces qui s'exercent sur ces ions permettent de déterminer leur *rapport masse /charge*, donc éventuellement leur nature.

■ À titre d'exemple, si l'on ionise, par un bombardement d'électrons, un échantillon de méthanol (CH_3OH) passé à l'état de gaz, une petite fraction des molécules est transformée en espèces porteuses de charges, parmi lesquelles les ions positifs CH_3OH^+ . Ces ions, formés dans un état excité, disposent d'un surplus d'énergie ce qui provoque pour beaucoup d'entre eux leur fragmentation quasi immédiatement. Tous, cependant, ne se dissocient pas de la même façon, si bien qu'il se forme toute une collection d'ions de masses inférieures à celle des molécules de méthanol de départ. D'une manière générale, ces fragments, nés de coupures de liaisons et de réactions de réarrangement subséquentes, sont porteurs d'informations sur la molécule initiale (fig. 16.1a).

Les résultats sont présentés au moyen d'un graphe appelé *spectre de masse* sur lequel figurent les abondances des ions formés classés par ordre croissant de leur rapport masse/charge (fig. 16.1). En opérant dans des conditions identiques, la fragmentation est reproductible et de ce fait, caractéristique du composé étudié. Ce dernier est détruit par l'analyse.

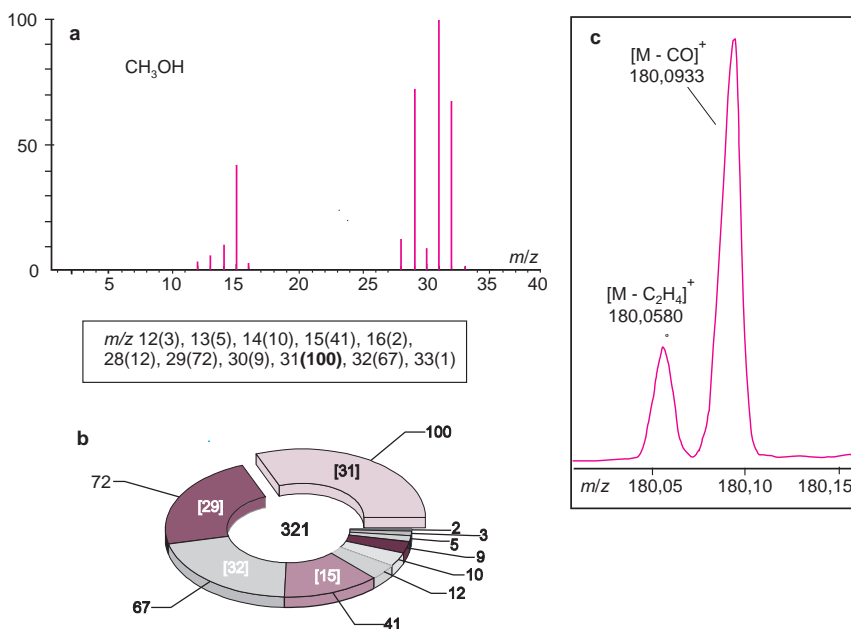


Figure 16.1 Spectre de fragmentation et spectre de masse présentés sous forme graphique ou tabulaire.

a) Spectre de fragmentation du méthanol; b) représentation non conventionnelle du même spectre sous forme d'un diagramme circulaire : statistiquement, pour 321 ions formés, il y en a 100 de masse 31 u (Da), 72 de masse 29, etc. Les divers ions constituent autant de populations différentes; c) partie d'un enregistrement haute résolution d'un composé M présentant deux ions de masse voisine (l'un par perte de CO et l'autre de C₂H₄).

Le concept de la méthode apparaît dans la succession d'étapes auxquelles l'échantillon est soumis :

- **Ionisation** : l'échantillon porté sous forme de gaz ou de vapeur est ionisé dans la *source* de l'appareil. De nombreux procédés sont utilisables pour cette première étape. À ce stade, tout composé formé de molécules conduit à un mélange statistique d'ions de fragmentation.
- **Accélération** : aussitôt formés, les ions sont extraits de cette partie de l'appareil, *focalisés* et *accélérés* par des lentilles électroniques, pour accroître leur énergie cinétique.
- **Séparation** : les ions sont alors « filtrés » suivant leur rapport masse/charge par l'*analyseur*, certains appareils combinant plusieurs types d'analyseurs en série.
- **Détection** : après séparation, les ions terminent leur course en venant frapper le capteur d'un *détecteur* dont le signal est proportionnel aux charges des ions reçus.

► *Affichage du spectre de masse* issu du traitement du signal envoyé par le détecteur.

■ La méthode ne permet d'accéder qu'au rapport masse /charge des ions, m/q . Logiquement pour calculer m , il faudrait donc connaître q . Comme ces ions portent une charge du type $q = ze$ (e représentant la charge élémentaire de l'électron et z un nombre entier petit), on dit qu'on détermine m au facteur z près. C'est pourquoi l'échelle du spectre porte comme indication m/z (m étant en unités atomiques). Pour les molécules petites ou moyennes ($M < 1\,000$), qui génèrent des ions, généralement tous porteurs d'une charge unitaire ($z = 1$), l'ordre croissant en masses est donc le même que celui du rapport m/z . L'usage admet alors de graduer le spectre en unités de masse atomique unifiée (u). Dans le cas général m/z est en thomsons (Th) unité rarement indiquée.

Le spectre de masse peut correspondre à deux types de tracés très différents :

- le *spectre continu* (le profil) de l'intervalle de masses sélectionné. Le tracé correspond à un ensemble de signaux en forme de pics plus ou moins larges selon la qualité de l'instrument (fig. 16.1c). Ces pics, répartis en fonction de leur masses, permettent de déterminer les masses des ions avec une précision qui atteint 10^{-5} Da pour les meilleurs appareils. La limite supérieure en masse, en constante progression, dépasse 10^6 Da.
- *spectre de fragmentation* (« spectre-barres » ou diagramme en bâtonnets). Il correspond à la répartition de tous les ions formés, regroupés aux *masses nominales* (cf. tabl. 16.1) les plus proches de leurs masses réelles et présentés sous forme de traits verticaux. Le type d'ion le plus abondant conduit au pic le plus intense, appelé *pic de base*, auquel on donne l'indice 100. Les intensités des autres pics s'expriment en % du pic de base. Cette représentation graphique des masses réparties en populations, dont les hauteurs sont proportionnelles à leurs abondances correspond à un histogramme (fig. 16.1a,b). De tels diagrammes sont faciles à archiver et à comparer en vue de faire des identifications. Cette présentation normalisée, qui conduit au type de tracé le plus courant en analyse, a cependant pour inconvénient qu'à une même masse nominale il peut correspondre des ions de composition atomique différente.

■ L'expression « spectre de masse » ne doit pas prêter à confusion : l'appareil ne conduit pas à un spectre au sens le plus habituel de ce terme, rencontré dans les méthodes basées sur l'interaction entre un échantillon et des radiations lumineuses. L'origine de cette expression vient probablement de la ressemblance entre les enregistrements obtenus avec les appareils anciens et ceux des spectrographes qui permettaient une exploration du spectre optique dans l'espace. La spectrométrie de masse ne fait pas partie des méthodes de spectroscopie optique.

La spectrométrie de masse est devenue progressivement un moyen d'investigation irremplaçable des composés structurés que l'on rencontre aussi bien en chimie organique qu'en biochimie (notamment en protéomique). Elle s'applique également à l'analyse de la composition élémentaire des milieux inorganiques (technique ICP /SM). Elle permet aussi l'étude des échantillons comportant des mélanges moléculaires, à condition de séparer les composés en amont du spectromètre de masse avec un chromatographe par exemple. Les couplages *en ligne* CPG /SM ou CLHP /SM font partie des meilleures méthodes d'analyse des mélanges (infimes quantités d'échantillons complexes).

■ L'identification des composés moléculaires par spectrométrie de masse peut se faire à partir de l'un ou de l'autre des deux types de tracés de spectres. La première méthode consiste à reconstituer la structure du composé à la manière d'un puzzle. C'est un exercice d'autant plus difficile que la masse est élevée. Les fragmentations successives des ions sont complexes. La tâche se simplifie si on dispose de plusieurs spectres enregistrés dans des conditions différentes et de logiciels d'aide à l'interprétation. La seconde méthode fait appel à une spectrothèque répertoriant un grand nombre de spectres de fragmentation, parmi lesquels, dans le cas favorable, on trouvera le spectre du composé étudié.

16.2 LE SPECTROMÈTRE DE BAINBRIDGE (1933)

L'idée d'accéder à la masse des ions en les soumettant à l'action d'un champ magnétique est à la base d'un montage ancien attribué à Bainbridge vers 1930 pour étudier les isotopes (fig. 16.2). Son étude est intéressante car les équations classiques qui décrivent le mouvement des ions dans les champs magnétiques ou électriques de ce montage historique sont toujours de mise pour comprendre comment fonctionne une des catégories actuelles de spectromètres de masse.

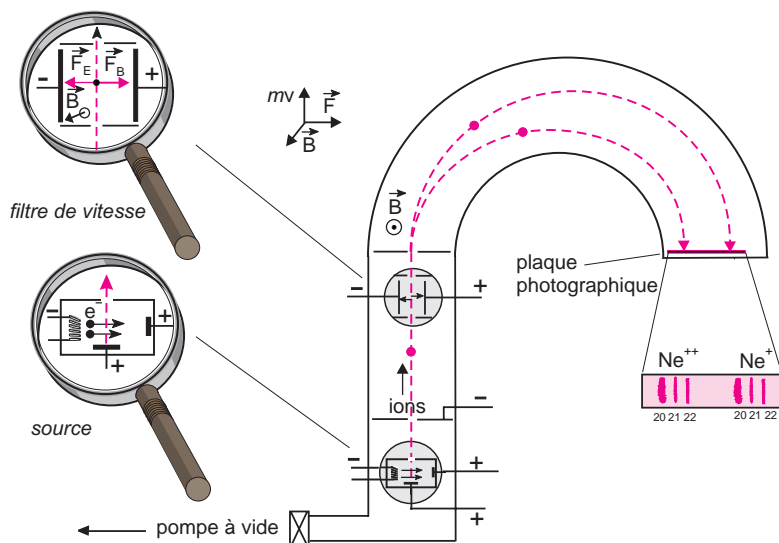


Figure 16.2 Spectrographe de Bainbridge à déflexion magnétique de 180°, comportant un filtre de vitesse.

Ce dernier permet de s'affranchir de la quasi-impossibilité d'avoir des faisceaux hétérogènes monocinétiques. Dessin d'un enregistrement sur plaque photographique du spectre du néon. Les deux séries de taches résultent de l'arrachement de un ou de deux électrons aux différents isotopes de l'élément néon (m/z : $^{20}\text{Ne}^+$, $^{21}\text{Ne}^+$, $^{22}\text{Ne}^+$; $^{20}\text{Ne}^{++}$, $^{21}\text{Ne}^{++}$, $^{22}\text{Ne}^{++}$)⁽¹⁾ Mais la paternité de ces montages revient à J.-J. Thomson qui, dès 1913, prouve l'existence des isotopes du néon ainsi qu'à Aston, pour le soufre et le chlore.

(1) Le symbole + signifie qu'il s'agit à la fois d'un radical (nombre impair d'électrons) et d'un cation.

Dans ce montage, les ions positifs créés sont d'abord accélérés par une différence de potentiel U . Ils prennent une vitesse v qui dépend de leur masse m (cf. § 16.3.1). Ces ions sont alors soumis à un champ magnétique transversal \mathbf{B} responsable d'une densité de flux magnétique B . Cette orientation du champ ne modifie pas leur vitesse mais provoque leur déviation selon des trajectoires circulaires dont le rayon est fonction de leur masse.

La relation fondamentale de la dynamique $\mathbf{F} = m \cdot \mathbf{a}$ (\mathbf{a} désignant l'accélération), appliquée aux ions m sur lesquels s'exerce la force de Lorentz $\mathbf{F} = q \cdot \mathbf{v} \wedge \mathbf{B}$, permet d'écrire :

$$\mathbf{a} = \frac{q}{m} \mathbf{v} \wedge \mathbf{B} \quad (16.1)$$

L'orientation de \mathbf{B} est telle que seule la composante centripète du vecteur accélération \mathbf{a} intervient. La trajectoire de l'ion est dans un plan perpendiculaire à B et contenant \mathbf{v} . De ce fait, $\mathbf{a} = v^2/R$, soit, en remplaçant l'accélération par sa valeur $a = q \cdot v \cdot B/m$ (où $q = z \cdot e$ est en coulomb, v en m/s, B en Tesla et m en kg) :

$$R = \frac{m \cdot v}{z \cdot e \cdot B} \quad (16.2)$$

La relation précédente montre que la séparation se fait suivant le *moment* des ions (leur *quantité de mouvement*). Pour accéder au rapport m/z des ions (16.3), il faut connaître leur vitesse v .

$$\frac{m}{z} = \frac{R \cdot B \cdot e}{v} \quad (16.3)$$

Pour cela on utilisait, dans les anciens appareils, un dispositif situé en amont du secteur magnétique, appelé *filtre de vitesse*.

En soumettant les ions à deux forces opposées par action d'un champ électrique et d'un champ magnétique, seuls ne pouvaient sortir du filtre que les ions restant sur la trajectoire centrale.

La résultante devant être nulle, on a : $qE = q \cdot v \cdot B$, si bien que $v = E/B$.

■ **Force de coulomb et formule de Lorentz.** Lorsqu'on crée une différence de potentiel de V volts entre deux plaques parallèles séparées d'une distance d , il apparaît un champ électrique \mathbf{E} ($V \cdot m^{-1}$), uniforme si le milieu est homogène, et orienté vers les faibles potentiels. On pose $\mathbf{E} = \mathbf{V}/d$. \mathbf{E} détermine la force de Coulomb \mathbf{F} qui s'exerce sur l'ion porteur de la charge q , quelle que soit sa masse et placé dans ce champ. $\mathbf{F} = q \cdot \mathbf{E}$ (si l'ion est porteur d'une seule charge élémentaire, $q = e = 1,6 \times 10^{-19}$ C). La force de Coulomb est indépendante de la vitesse de l'ion.

La force qui s'exerce sur un ion porteur d'une charge q , animé d'une vitesse \mathbf{v} et soumis à l'action d'une induction magnétique \mathbf{B} , est donnée par la formule de Lorentz que l'on écrit : $\mathbf{F} = q \cdot \mathbf{v} \wedge \mathbf{B}$. Cette expression (16.4) est déduite de la loi générale de Laplace qui exprime la force à laquelle est soumis un conducteur de longueur $d\mathbf{l}$, parcouru par un courant I , dans une induction magnétique \mathbf{B} . La direction de la force de Lorentz ($d\mathbf{F} = I d\mathbf{l} \wedge \mathbf{B}$) peut se retrouver par diverses recettes, telle la règle des trois doigts de la main droite, ou à partir des orientations d'un trièdre direct.

16.3 ANALYSEURS ÉLECTROMAGNÉTIQUES DE TYPE « EB »

Les spectromètres actuels à secteur magnétique correspondent à l'évolution technologique des montages tel celui de Bainbridge. Ils conduisent à des rapports m/z très précis, mais ils sont assez vite limités pour l'étude des masses élevées (difficulté de réalisation d'un secteur magnétique d'un volume important). Ils comportent également, entre l'accélérateur d'ions et le secteur magnétique (B), un secteur électrostatique (E) (fig. 16.3).

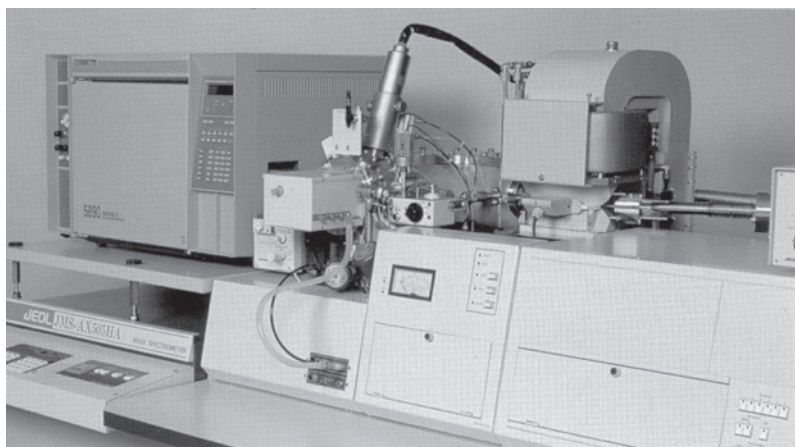
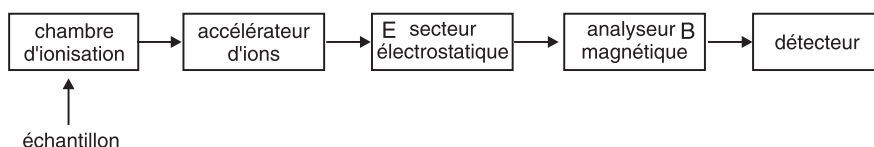


Figure 16.3 Un appareil conçu autour d'un analyseur électromagnétique. Modèle JMS AX505 de la Société Jeol. On reconnaît sur cette photographie, la forme caractéristique de l'électroaimant (secteur magnétique). Le détecteur est à l'extrême droite et la source de l'appareil est au centre de la photographie. Dans la configuration représentée, on notera également que l'appareil est en aval d'une installation de CPG (reproduit avec l'autorisation de la société Jeol, Japon).

■ Connue sous le nom de **séparation électromagnétique**, l'utilisation de spectromètres de masse à l'échelle préparative (calutrons) a permis aux États-Unis d'isoler, en 1943, quelques kg de ^{235}U pour la fabrication des premières bombes atomiques (projet Manhattan). Ce vieux procédé, qui donne un débit infime sous 10^{-3}Pa , a été par la suite, périodiquement utilisé jusqu'à nos jours, par d'autres pays.

16.3.1 Accélérateur d'ions

Environ 5 % des ions positifs formés soit dans la chambre d'ionisation soit en amont du spectromètre, selon la méthode d'ionisation de l'appareil, vont effectuer le parcours qui va les mener jusqu'au détecteur.

La première étape consiste à les accélérer au moyen de plusieurs plaques portées à des potentiels négatifs croissants, la tension totale U étant comprise entre 2 et 10 kV (fig. 16.4).

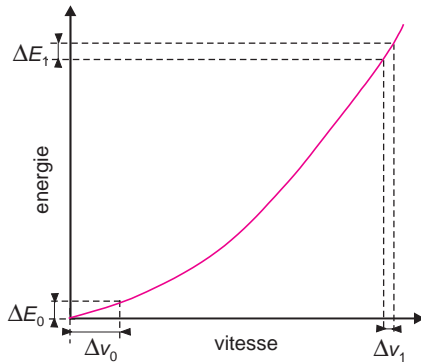


Figure 16.4 Effet de la tension accélératrice sur la dispersion

des vitesses des ions d'une même masse. En admettant que la dispersion des vitesses avant accélération est représentée par Δv_0 , la plage de vitesse après accélération Δv_1 est beaucoup plus petite. ($\Delta E_1 = \Delta E_0$ mais $\Delta v_1 \ll \Delta v_0$).

Le vide doit être excellent ($P < 10^{-4}$ Pa) pour éviter la formation d'arcs électriques et minimiser les collisions entre ions. Les ions porteurs d'une charge $q = z \cdot e$ acquièrent tous la même énergie cinétique E_1 donnée par la relation 16.5. Leur vitesse après accélération est donc inversement proportionnelle à la racine carrée de leur masse m_i (16.6).

$$E_1 = z \cdot e \cdot U = \frac{1}{2} m_i \cdot v_i^2 \quad (16.5)$$

$$v_i = \frac{\sqrt{2 z e U}}{m_i} \quad (16.6)$$

Cependant leur vitesse avant accélération n'étant pas nulle, leur énergie cinétique totale doit tenir compte de leur énergie cinétique initiale, E_0 , faible et indéterminée :

$$E_{(\text{totale})} = E_1 + E_0 \quad (16.7)$$

La précision des masses obtenues sera d'autant meilleure que les ions individuels d'une même masse auront même vitesse. Pour cette raison, on donne à la tension U une valeur élevée afin de restreindre la plage de vitesse pour une même espèce d'ions (fig. 16.4).

16.3.2 Secteur électrique

Pour améliorer encore la précision des mesures de masses, la non-homogénéité en énergie précédente va être encore améliorée en faisant passer les ions tangentiellement dans un secteur constitué par deux électrodes cylindriques concentriques (fig. 16.5).

La force, qui s'exerce sur les ions, ne modifie pas leur énergie car elle est perpendiculaire à la trajectoire centrale de rayon R' imposé (fig. 16.5). Elle est donc équivalente, en grandeur, à $F = v^2/R'$. En remplaçant le produit mv^2 par son équivalent en fonction de la tension accélératrice ($m \cdot v^2 = 2z \cdot e \cdot U$), on aboutit à la relation 16.8 fixant les conditions de passage des ions dans le filtre radial de l'instrument. Lorsque E et U vérifient cette expression, seuls les ions ayant l'énergie acquise sous l'effet de la tension U suivront la trajectoire de rayon R' et pourront sortir du filtre. Ce dispositif joue le rôle d'un *filtre en énergie*. On montre qu'il est également *focalisateur en direction*. Il redresse les trajectoires qui, à l'entrée du secteur, sont quelque peu divergentes. Connaissant la ddp V entre les plaques du

secteur, distantes de d , on peut accéder à E et à la corrélation qui doit être appliquée entre U et V :

$$E = \frac{2U}{R'} = \frac{V}{d} \quad (16.8)$$

16.3.3 Analyseur magnétique

Dans la configuration du type EB, on trouve à la suite du secteur électrostatique l'analyseur (ou secteur) magnétique. Les appareils se partagent entre le montage Nier-Johnson pour lequel la courbure imposée aux ions par le champ magnétique est de même sens que la courbure due au secteur électrostatique et le montage de type Mattauch-Herzog où ces deux courbures sont opposées en direction (fig. 16.5). Dans ce dernier cas, si l'analyseur magnétique a une géométrie adaptée, le montage devient focalisateur pour toutes les masses simultanément, condition nécessaire pour les spectromètres à plusieurs détecteurs prévus pour l'étude des rapports isotopiques. En éliminant la vitesse v , par combinaison des relations 16.2 et 16.5, on aboutit à la *formule de déflexion* (16.9) des appareils à secteur magnétique :

$$\frac{m}{z} = \frac{R^2 B^2 e}{2U} \quad (16.9)$$

Seuls les ions ayant suivi la trajectoire de rayon R , correspondant à la courbure du tube guide de l'appareil, pourront être détectés. Pour obtenir le spectre de masse dans l'intervalle choisi, l'appareil modifie progressivement la densité de flux B . Tous les ions, quel que soit m/z , suivent tour à tour l'unique trajet qui aboutit au détecteur. Un tel balayage exige environ $1/10^6$ seconde.

■ L'interdépendance de m et U est à la base d'une méthode comparative de détermination précise des masses, connue sous le nom de *peak matching*. Pour cela on co-injecte avec le composé X , à l'origine de l'ion dont on veut déterminer la « masse exacte », un composé perfluoré, dont on connaît avec une grande précision les masses des ions de fragmentation. On choisit comme repère un ion dont la masse est voisine de celle que l'on cherche à déterminer (à titre d'exemple, pour une masse de l'ordre de 200 u, on prendra l'ion C_4F_8 dont la masse est de 199,9872 u et pour les masses proches de 12, on se servira du pic du carbone 12, qui vaut 12 u par définition). Techniquement on utilise un comparateur de pics composé d'un oscilloscope et d'une série de résistances de précision, pour modifier de manière détournée U .

$$m_x/m_{\text{réf}} = U_{\text{réf}}/U_x \quad (16.10)$$

Le secteur magnétique encore appelé *prisme magnétique* est, comme le secteur électrostatique, focalisateur en direction : un faisceau d'ions identiques, abordant le secteur magnétique en F_1 sous un petit angle de divergence α , est focalisé en F_2 , image de F_1 . À chaque instant seuls les ions d'une même masse peuvent suivre la trajectoire de rayon R (fig. 16.5). Ces montages EB permettent grâce aux deux secteurs de corriger à la fois les aberrations angulaires et énergétiques des ions (focalisation *en énergie et en direction*) sans perte de résolution. Les dimensions et le poids de l'aimant limitent l'étude des masses élevées.

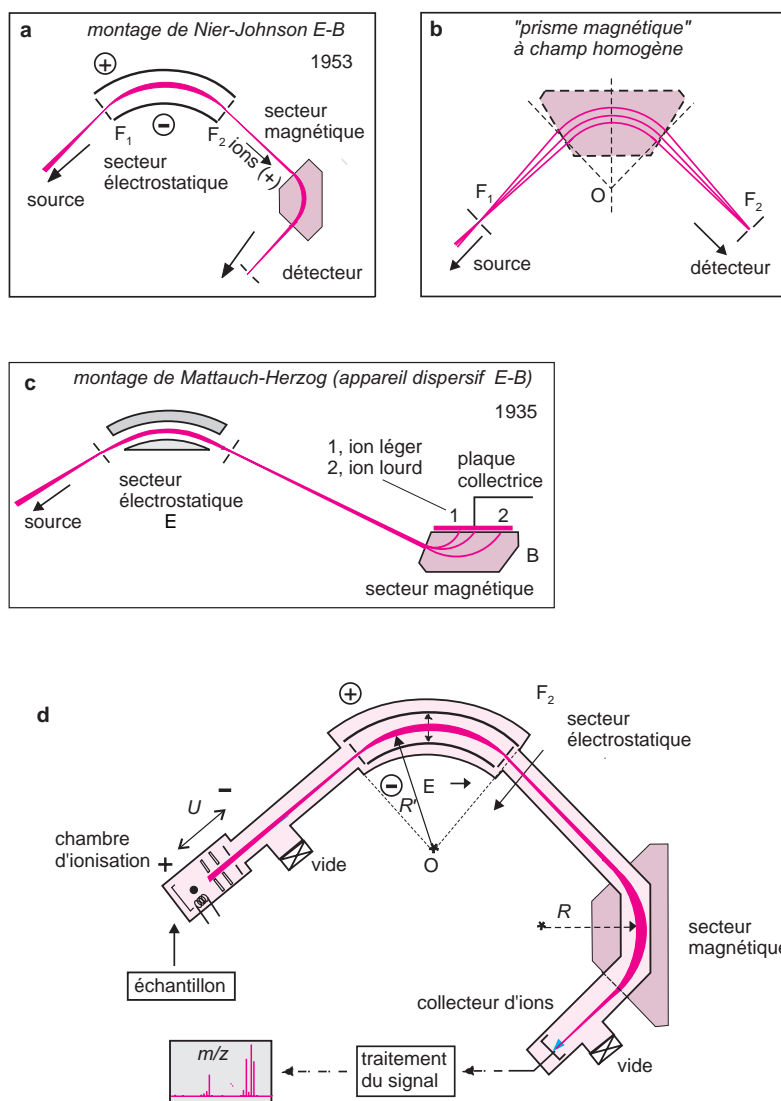


Figure 16.5 Spectromètres de masse à analyseur magnétique.

a) Montage de Nier-Johnson ; b) aspect focalisateur en direction du secteur magnétique (les faces d'entrée et de sortie sont obliques par rapport à l'angle d'incidence du faisceau pour assurer la focalisation ; c) montage de Mattauch-Herzog ; d) agencement de principe d'un spectromètre à double focalisation (ex. $R' = 40$ cm et $R = 60$ cm).

16.4 ANALYSEURS À TEMPS DE VOL (TOF)

Le principe des spectromètres à temps de vol (en anglais, *Time of Flight*), repose sur la relation entre masse et vitesse des ions. L'instrument mesure le temps nécessaire aux ions, formés par un procédé impulsionnel, pour parcourir dans le vide une distance L sans champ (fig. 16.6). La relation fondamentale des appareils TOF à parcours linéaire s'obtient en

éliminant v dans l'expressions 16.5, sachant que $L = v \cdot t$:

$$\frac{m}{z} = \left(\frac{2eU}{L^2} \right) t^2 \quad (16.11)$$

Cette catégorie de spectromètres permet d'atteindre des masses très élevées (300 kDa). Pour évaluer les masses avec précision, il faut maîtriser la dispersion énergétique et spatiale initiales des ions. Afin que les ions démarrent tous au même instant, on provoque une ionisation quasi instantanée (quelques nanosecondes avec un laser par exemple), répétée un grand nombre de fois. Pour neutraliser la dispersion énergétique des ions d'une même masse, beaucoup d'appareils comportent un *réflecteur* (fig. 16.6). Les ions les plus rapides pénètrent plus avant dans la zone de champ de ce miroir électrostatique et sont donc plus fortement repoussés vers le collecteurs d'ions. Les ions d'une même masse sont ainsi refo- calisés.

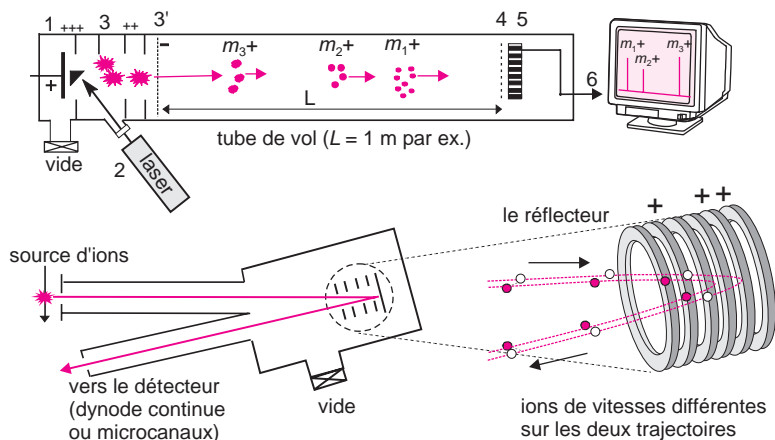


Figure 16.6 Spectromètre à temps de vol à parcours direct et principe du réflecteur d'ions.

1) Échantillon et porte-échantillon ; 2) dispositif MALDI d'ionisation ; 3 et 3') grilles d'extraction et d'accélération (ddp 5 000 V) ; 4) grille de contrôle ; 5) collecteur plan à microcanaux ; 6) sortie du signal. Le dessin du bas représente un *réflectron* dont le « miroir électrostatique » égalise les temps de vols (quelques μs) des ions de même masse mais dont les énergies initiales diffèrent. Les largeurs de pics sont de l'ordre de 10^{-9} s et la résolution atteint désormais 15 à 20 000.

■ **Spectromètres à mobilité d'ions (IMS).** Plusieurs sociétés commercialisent des analyseurs portatifs pour la recherche de composés volatils connus, dans des domaines ciblés : produits pétroliers, agents chimiques toxiques et militaires, polluants. Ces appareils sont également basés sur le temps de parcours que mettent des ions pour se déplacer d'une source à un détecteur, dans un tube à pression atmosphérique (fig. 16.7). Le déplacement des ions ne se faisant pas sous vide, explique le grand nombre d'applications potentielles sur le terrain au moyen d'instruments portables. Cette technique, différente de la spectrométrie de masse à temps de vol à laquelle on la compare à tort quelquefois, correspond en fait à une « électrophorèse en phase gazeuse ». Au voisinage de la source, constituée d'un film de ^{63}Ni (émetteur β^-), ou d'une lampe UV, l'air forme des agrégats ioniques $[(\text{N}_2)_x (\text{H}_2\text{O})_y \text{H}]^+$ et $[(\text{N}_2)_x (\text{H}_2\text{O})_y \text{O}_2]^-$ qui vont se fixer sur les molécules des composés présents, suivant leur affinité électronique. Cette sorte d'ionisation chimique conduit à un aérosol qui migre en

quelques millisecondes sous l'effet d'un champ électrique dont on choisit l'intensité (200-400 V/cm) et la polarité. La mobilité des ions dépend non seulement de leur masse, de leur charge et de leur taille, mais aussi de la température et de la pression d'air. Le seuil de détection peut atteindre le ppb. On définit la mobilité ionique K_{ion} de chaque composé par une relation copiée sur l'électrophorèse capillaire. En appelant v sa vitesse, L la distance parcourue pendant le temps t_M dans le champ E , ($E = V/L$) on obtient la relation 16.12 :

$$K_{\text{ion}} = v/E = \frac{L}{t_M} \cdot L/V \quad (16.12)$$

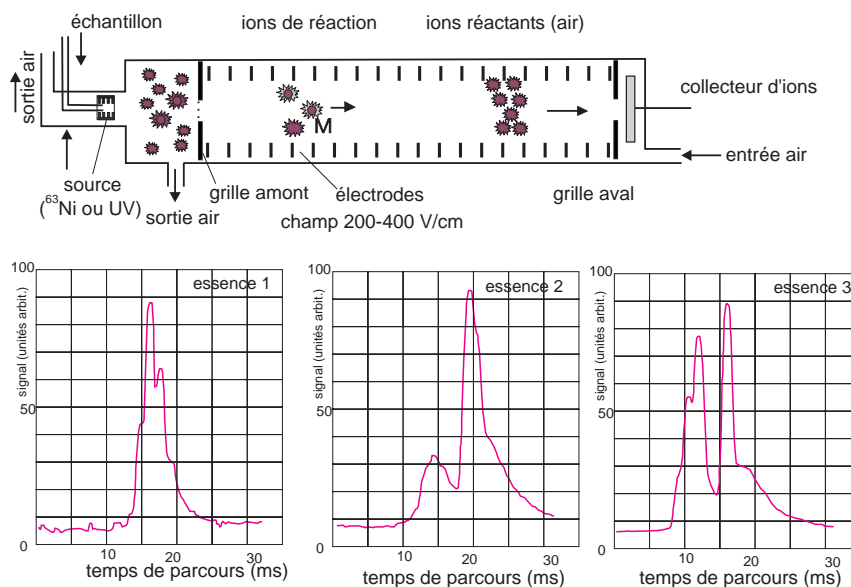


Figure 16.7 Spectromètre à mobilité ionique.

Les ions sont admis de manière répétitive dans le tube analyseur en contrôlant la polarité de la grille amont. Exemples d'enregistrements obtenus à partir de 3 proches produits pétroliers, montrant ainsi qu'on peut attribuer des profils différents à chacun d'eux (reproduit avec l'autorisation de la société GAS mbH, Allemagne). Les armées des différents pays font beaucoup appel à cette technique.

16.5 ANALYSEURS À FILTRE QUADRIPOLAIRE PAR TRANSMISSION

À côté des instruments précédents, d'autres appareils moins encombrants, aux performances plus modestes, mais moins coûteux se sont développés pour traiter des applications n'exigeant pas des spectres de grande résolution. C'est dans cette catégorie, que se situent les appareils à champ électrique seul, basés sur l'utilisation de filtres quadripolaires pour trier les ions. Ces spectromètres, qui forment la catégorie la plus répandue, sont très utilisés comme détecteurs de masses (installations couplées CPG ou CLHP /SM ou ICP/SM) ainsi que dans nombre d'applications industrielles concernant l'analyse des gaz et des atmosphères résiduelles dans les techniques du vide.

16.5.1 Potentiel et champ électrique dans un quadripôle

Un quadripôle est formé de quatre barres métalliques parallèles ($L = 5$ à 20 cm) à section hyperbolique dans la partie intérieure au montage (fig. 16.8). Les barres opposées, dont la distance de contact est désignée par $2r_0$, constituent deux électrodes portées au même potentiel électrique tandis que les potentiels entre deux barres voisines sont opposés (ddp U).

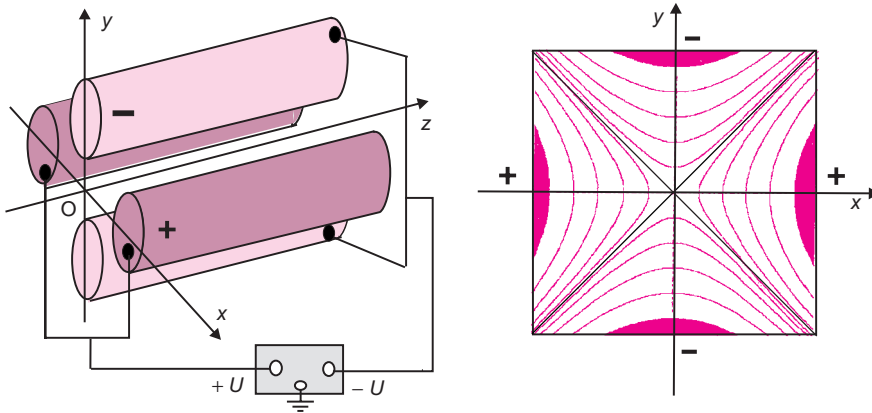


Figure 16.8 Représentation d'un quadripôle.

Noter le raccordement des barres 2 à 2. Ce dispositif mécaniquement simple exige un usinage précis des barres taillées en forme hyperbolique. Dans beaucoup de modèles les barres ont la taille d'un crayon bille. À droite, tracé d'une série d'hyperboles équipotentielles dans la partie centrale du filtre.

Le potentiel Φ en tout point de l'espace intérieur au quadripôle a pour valeur, quel que soit z :

$$\Phi = U \cdot \frac{x^2 - y^2}{r_0^2} \quad (16.13)$$

Φ est compris entre $-U$ et $+U$. Pour un milieu homogène, le potentiel Φ est donc nul tout le long de l'axe optique Oz .

L'expression 16.13 implique que dans tout plan xOy les points ayant même potentiel sont situés sur les branches d'une hyperbole équilatère dont les asymptotes sont les droites $y = \pm x$. Les lignes de champ électrique sont orthogonales aux courbes équipotentielles, en chaque point M_{xyz} de l'espace intérieur. Ce champ a pour valeur :

$$E = - \text{grad } \Phi$$

La surface des barres en regard de la partie intérieure au quadripôle épouse la forme d'hyperboles dont les expressions analytiques sont :

barres x	$\Phi = +U$	\Rightarrow	$y^2 = x^2 - r_0^2$
barres y	$\Phi = -U$	\Rightarrow	$y^2 = x^2 + r_0^2$

Lorsqu'un ion positif pénètre par le point O dans le filtre maintenu sous vide, les composantes de son vecteur vitesse, dans les trois directions xyz , vont déterminer sa trajectoire. La zone centrale se comporte comme un espace en forme de tuyau d'axe Oz , dont la paroi

peut attirer ou au contraire repousser l'ion suivant l'endroit où il se trouve. Les deux barres chargées positivement le focalisent suivant l'axe Oz, correspondant au fond d'une vallée de potentiel (zone de stabilité), alors que les deux barres chargées négativement, au contraire, le défocalisent (apparition d'une bosse de potentiel, plan yOz instable).

■ L'image d'une bille qu'on fait rouler dans le fond d'une gouttière en position horizontale figure assez bien à quoi ressemble une vallée de potentiel. Pour imaginer l'effet d'une bosse de potentiel, il faut cette fois faire rouler la bille sur le dos de la gouttière retournée : la trajectoire sera instable.

16.5.2 Utilisation d'un quadripôle linéaire comme filtre à ions

On superpose à la tension continue U , une tension alternative V_{RF} de fréquence ν et d'amplitude maximale V_M (ν est de l'ordre de 2 à 6 MHz et V_M/U de 6). Les tensions alternatives sont déphasées de π entre les jeux de barres (fig. 16.9).

$$V_{RF} = V_M \cos(2\pi\nu t) \quad (16.14)$$

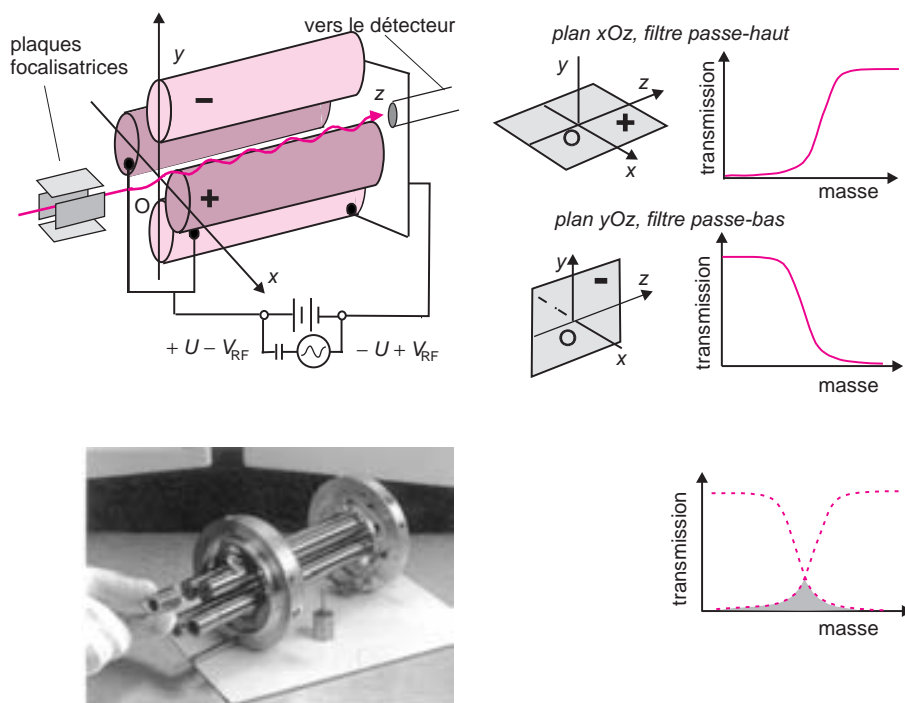


Figure 16.9 Filtre quadripolaire.

Suivant leur masse, les ions répondent plus ou moins facilement aux sollicitations du champ variable. Leur durée de parcours doit être supérieure à période de la radio-fréquence. Pour cette raison ils entrent dans le filtre avec une énergie cinétique de quelques dizaines d'eV seulement. Modèle de quadripôle avec préfiltre (Société Fisons).

Au cours du temps, en chaque point à l'intérieur du filtre, le potentiel correspond maintenant à la somme algébrique des expressions 16.13 et 16.14 :

$$\Phi_{xy} = [U + V_M \cos(2\pi\nu t)] \frac{x^2 - y^2}{r_0^2} \quad (16.15)$$

Le champ résultant comporte donc une partie fixe et une partie variable. Dans ces conditions, les ions, qui pénètrent en O dans le quadripôle, sont soumis à une force variable en intensité et en direction. Ils vont suivre des trajectoires complexes, tridimensionnelles généralement instables, en forme d'hélice de tire-bouchon, qui vont s'achever en venant frapper l'une des barres.

Pour obtenir les équations du mouvement d'un ion, on doit calculer les forces F_x , F_y et F_z qui s'exercent sur lui (*équations de Mathieu*). Ces calculs étant complexes, on se contentera d'étudier deux cas particuliers.

- Supposons un ion sans composante de vitesse suivant Oy : la trajectoire restera dans le plan xOz. Les parois étant alternativement positives ou négatives ($V_M \gg U$), les ions lourds, de par leur inertie trop grande, ne pourront pas suivre les variations d'orientation du champ : ils ne ressentiront que la tension continue U positive. Ils seront peu perturbés. Mais les ions légers pourront osciller de plus en plus jusqu'à venir se décharger, donc se perdre, sur une des barres. Les deux barres positives constituent ce qu'on appelle un *filtre passe-haut*.
- Prenons maintenant le cas d'un ion qui n'aurait pas de composante de vitesse suivant Ox : la trajectoire restera dans le plan yOz. Les ions lourds continueront à être inexorablement attirés vers les barres négatives. Seuls les ions légers vont pouvoir être éventuellement récupérés. On est en présence d'un *filtre passe-bas*.

Les calculs afférents à cette technique montrent qu'il y a deux manières d'utiliser ce *filtre quadripolaire* : ou bien on maintient constantes les deux tensions U et V_{RF} et on fait un balayage de la fréquence ν , ou bien on maintient cette fréquence à une valeur donnée et on augmente régulièrement l'amplitude des tensions U et V de façon que leur rapport reste constant. On délimite ainsi une fenêtre dont la largeur est par exemple de 1 u , (résolution unitaire), qui permet d'obtenir de manière *séquentielle* le spectre de masse du composé.

- La résolution R des filtres quadripolaires dépend de nombreux paramètres dont la formule 16.16 permet de rendre compte. On peut utiliser ces appareils soit dans un mode où Δm est constant dans ce cas la résolution croît avec la masse, soit dans un mode où la résolution est constante, voisine de 1 u (fig. 16.10).

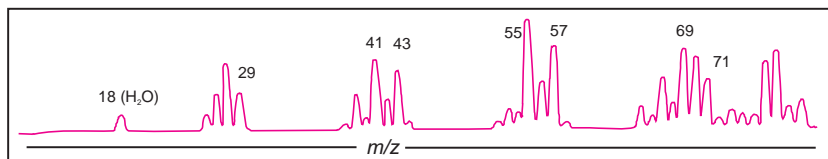


Figure 16.10 Spectre partiel d'un hydrocarbure obtenu avec un analyseur de gaz fonctionnant sur le principe du filtre quadripolaire. L'enregistrement montre que l'appareil a été utilisé dans le mode où Δm est constant sur toute l'étendue des masses.

La relation approchée 16.16 détermine la résolution maximum attendue pour un ion porteur d'une charge élémentaire e , accéléré sous une ddp de V_z volts à l'entrée du filtre de longueur L , de rayon r_0 en utilisant une radiofréquence dont la tension maximum est V_{\max} .

$$R = \text{Cste} \cdot \frac{L^2 \cdot V_{\max}}{r_0 \cdot e \cdot V_z} \quad (16.16)$$

16.6 ANALYSEURS À PIÉGEAGE D'IONS PAR QUADRIPOLE

Un dernier type d'appareil est représenté par des trappes à ions dont la géométrie est bien différente des quadripôles précédents. Les ions sont confinés entre deux électrodes de forme toriques, qui paraissent résulter d'une sorte d'anamorphose des quatre barreaux classique d'un quadripôle. En commun avec la catégorie précédente, ils fonctionnent sous l'effet d'un champ électrique variable (avec ou sans champ fixe). Simples en apparence, mais complexes d'un point de vue fondamental, ces détecteurs à piégeage d'ions sont très sensibles et permettent des techniques d'ionisation différentes. Le volume délimité par les électrodes, dites supérieure, inférieure et annulaire, constitue à la fois la source et le *filtre de masse* (fig. 16.11). Ces analyseurs, de construction moins coûteuse, sont toujours associés à une méthode séparative en amont (CPGSM).

De manière simplifiée, le fonctionnement peut se résumer comme suit : le composé soumis à un très bref bombardement d'électrons conduit à des ions qui pénètrent ensuite dans la partie centrale du filtre. Une radiofréquence fixe, appliquée à l'électrode annulaire, confine ces ions dans l'espace central en leur faisant décrire des trajectoires complexes, amorties par effet d'une faible pression d'hélium, de l'ordre de 0,01 Pa, également introduit dans cette trappe.

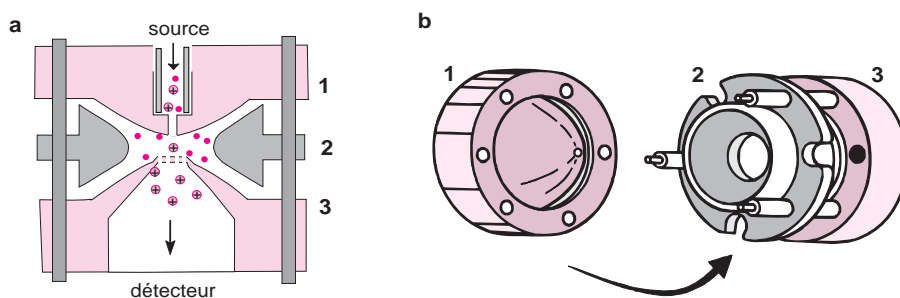


Figure 16.11 Spectromètres à piégeage d'ions.

a) Agencement des électrodes d'une trappe à ions; b) dessin en perspective des électrodes terminales et de l'électrode annulaire centrale (d'après *Current Sep.* 1997, 16 : 3, p 85).

Pour analyser les ions présents on augmente graduellement la tension de radiofréquence. Tour à tour, dans l'ordre des valeurs croissantes du rapport m/z , l'amplitude d'oscillation des ions croît dans la direction axiale et va jusqu'à leur expulsion par une série de petits trous percés dans l'électrode dite de sortie. Ils atteignent alors le détecteur (fig. 16.12).

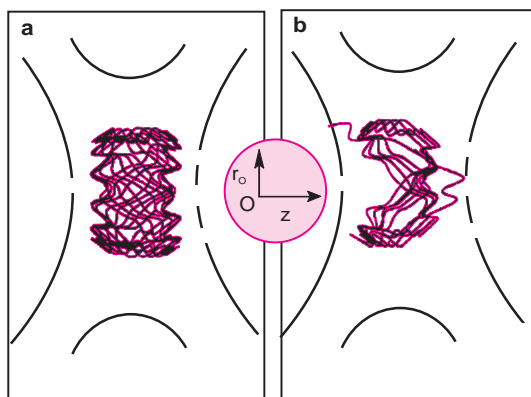


Figure 16.12 Modélisation du parcours des ions dans une trappe.

a) Parcours d'un ion stabilisé ; b) parcours d'un ion instable venant terminer sa trajectoire sur une des électrodes (la disposition du piège est la même que dans la figure précédente).

Si on mélange dans le piège un gaz réactant à l'échantillon on obtient directement une ionisation chimique (§16.10.2).

Ces appareils peu encombrants et très sensibles ont cependant pour défauts de présenter une gamme dynamique étroite et une répétabilité des spectres d'un même échantillon assez moyenne, ce qui est un gros handicap en analyse quantitative.

■ Tous les spectromètres de masses adoptent le principe des mesures comparatives. On étalonne l'appareil avec des ions de masses connues. Bien que des relations simples, dont certaines sont indiquées dans ce chapitre permettent de calculer les masses à partir de certains paramètres, elles restent des formules explicatives. Elles ne sont pas utilisées par les logiciels des spectromètres. Elles ne tiennent pas compte de facteurs secondaires propres à chaque montage.

16.7 ANALYSEURS À RÉSONANCE CYCLOTRONIQUE (FTMS)

Ces spectromètres, relativement peu répandus, font figure d'outsiders des appareils précédents. Apparentés aux pièges magnétiques à ions, ils permettent d'obtenir la masse des ions avec une très grande précision.

Le principe est le suivant : les ions, obtenus par un des nombreux procédés existants, sont dirigés vers une petite cavité placée au sein d'un champ magnétique \mathbf{B} très intense (4 à 9 teslas) créé par une bobine supraconductrice. Dans la cavité, les ions qui sont ralentis par des chocs sur les molécules résiduelles (le vide n'est pas parfait) restent confinés par effet des parois portées à des potentiels positifs. Leurs trajectoires sont complexes mais leurs projections dans un plan xy , normal à l'orientation du champ \mathbf{B} correspondent à des cercles (fig. 16.13). Le rayon de la circonférence dépend de l'énergie cinétique de l'ion et est donné par l'équation 16.2.

Si v est faible et B grand, la circonférence sera suffisamment petite (quelques mm). À partir des relations classiques $v = \omega \cdot R$ et $\omega = 2 \pi \cdot \nu$, on aboutit à l'équation 16.17.

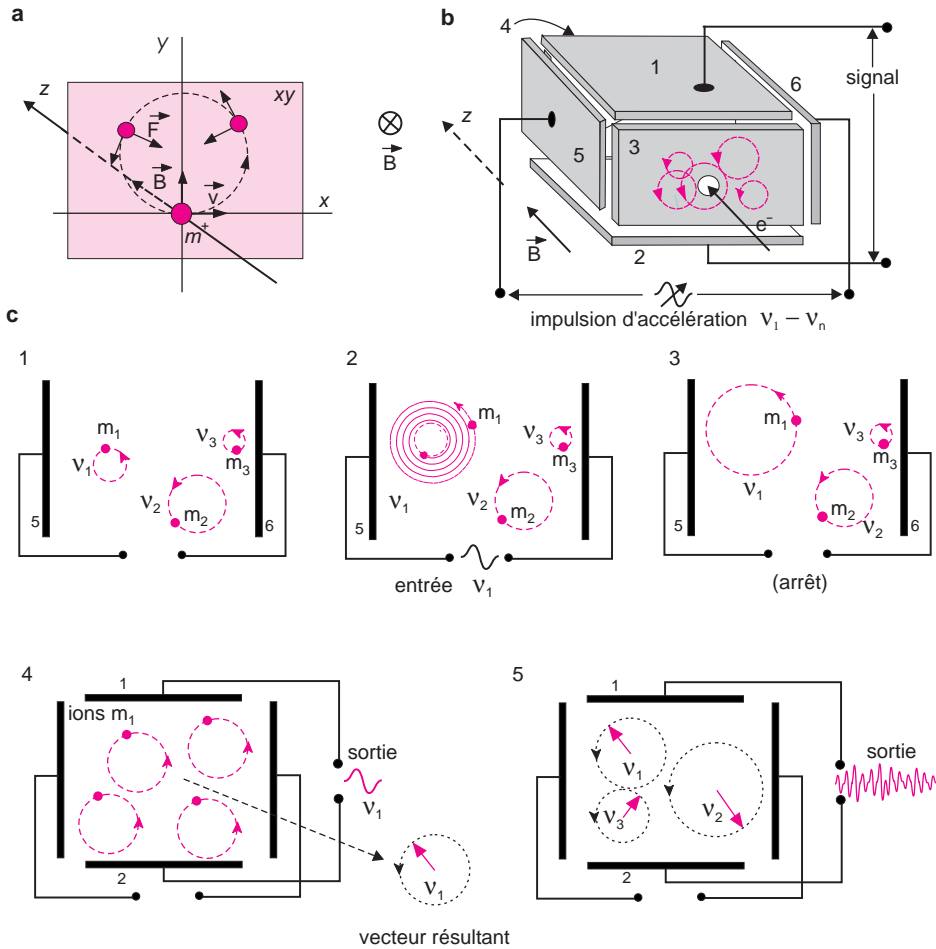


Figure 16.13 Le principe du spectromètre de masse à résonance cyclotronique. a) Trajectoire de base suivie par un ion soumis à une induction magnétique B compte tenu des orientations choisies. b) aspect simplifié d'une cellule de piégeage des ions (les plaques 5 et 6 sont excitatrices, les plaques 3 et 4 piègent les ions et les plaques 1 et 2 sont détectrices). Les ions sont formés soit dans la cellule soit en amont de celle-ci. c) principe de la détection : 1, trois ions en attente ; 2, impulsion de fréquence ν_1 : seul l'ion m_1 est excité ; 3, après excitation, l'ion m_1 tourne sur une orbite plus grande ; 4, pour un échantillon réel contenant un grand nombre d'ions m_1 , ceux-ci se mettent à tourner en phase. Ils produisent, sur les plaques détectrices 1 et 2, l'effet d'un vecteur champ électrique tournant à la même fréquence ν_1 dont l'intensité est fonction de leur concentration. Si les trois ions $m_1 - m_3$ ont été simultanément excités, le signal en sortie sera un interférogramme. Un calcul de Fourier conduit au spectre habituel.

Celle-ci montre qu'à chaque masse correspond une fréquence, *indépendante de la vitesse de l'ion*. Par conséquent il y aura, à un instant donné, autant de fréquences de rotation différentes que d'ions de rapports m/z eux-mêmes différents dans le piège.

$$\frac{m}{z} = \frac{e \cdot B}{2\pi\nu} \quad (16.17)$$

ou

$$\nu = 15\,350 \frac{B \cdot z}{m} \quad (16.18)$$

La formule pratique 16.18 donne la fréquence ν (en kHz) d'un ion de masse m (Da) porteur d'un nombre de charge z dans un champ B (Tesla). L'analyse des masses revient à déterminer avec précision les différentes fréquences des ions.

Pour repérer les fréquences, et par suite les rapports m/z des ions, on envoie une brève impulsion (1 ms) d'une bande de radiofréquences englobant toutes celles qui sont présentes. Ainsi tous les ions captent de l'énergie. Leurs fréquences ne changeant pas, ils décrivent pendant la durée de l'impulsion des orbites en spirales, donc leurs vitesses s'accroissent. Après impulsion, les ions d'un même rapport m/z sont réunis en un ensemble cohérent, phasé, qui provoque un signal (résonance cyclotronique) de même fréquence, au niveau des plaques détectrices (fig. 16.13). Globalement l'échantillon conduit à un signal complexe dû à la superposition des fréquences induites par toutes les populations m/z différentes. Cet interférogramme, dont l'intensité [$I = f(t)$] décroît lorsque l'excitation cesse, est une indication d'ensemble de toutes les fréquences dont il est issu. Les conditions sont réunies pour que le logiciel puisse faire l'analyse de Fourier, c'est à dire passer de $I = f(t)$ à $I = f(\nu)$, donc finalement au spectre de masse $I = f(m/z)$. Les ions ne sont pas détruits, ils peuvent être ré excités ou servir à d'autres expériences.

16.8 PERFORMANCES DES SPECTROMÈTRES DE MASSE

16.8.1 Limite en masse

Tout spectromètre permet de déterminer le rapport m/z jusqu'à une valeur maximum. La masse la plus élevée qui lui correspond, en daltons, dépend donc du nombre de charges z portées par l'ion. Par exemple si l'appareil peut mesurer les rapports masse /charge jusqu'à 2 000, il sera possible de détecter un ion de masse 80 000 Da porteur de 40 charges élémentaires ($q = 40e$).

16.8.2 Sensibilité

La sensibilité d'un spectromètre de masse se mesure en poids d'échantillon consommé par seconde (quelques pg/s ou femtomole/s) pour obtenir un signal d'intensité normalisée. Il y a renouvellement des ions en permanence. Les spectres sont obtenus par balayages successifs.

16.8.3 Pouvoir de résolution

Sur un spectre tracé en mode gaussien (obtenu avec un appareil à secteur magnétique ou à temps de vol ou cyclotronique), on pourra distinguer des masses d'autant plus voisines que les pics correspondants seront plus étroits. Cette propriété importante des appareils est repérée par le *pouvoir de résolution* R pour lequel plusieurs définitions coexistent.

Pour calculer R , on divise la valeur m/z du pic choisi par la largeur du pic $\Delta(m/z)$ repérée soit à mi-hauteur (*Full Width at Half Maximum*, FWHM) s'il s'agit d'un pic isolé, soit à 5 %

de la hauteur quand on considère deux pics voisins (figures 16.14 et 16.15).

$$R = (m/z)/\Delta(m/z) \quad \text{ou} \quad R = m/\Delta m \quad (16.18)$$

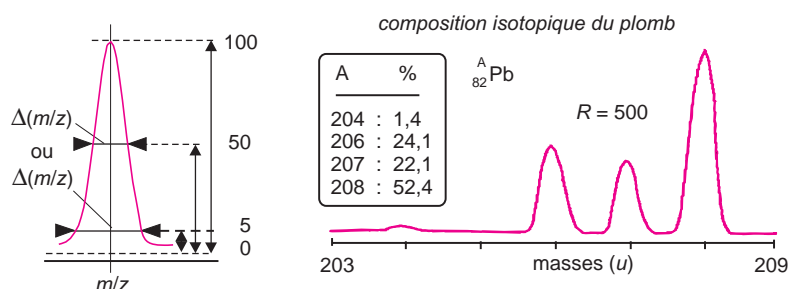


Figure 16.14 Pouvoir de résolution.

À gauche, situation de principe pour définir ce paramètre dans le cas d'un pic isolé. Suivant les constructeurs, la largeur du pic est mesurée soit à 50 % soit à 5 % de sa hauteur. À droite, exemple de spectre basse résolution d'un échantillon de plomb. La valeur trouvée pour le pouvoir de résolution dépend beaucoup du composé et de la masse choisie.

■ Les spectres de fragmentation présentés sous forme de bâtonnets ne permettent pas de faire ce calcul. Tout au plus peut-on dire que pour un tel spectre la résolution (et non le pouvoir de résolution) vaut exactement $1u$ (par exemple on distingue le pic 28 du pic 29, ou le pic 499 du pic 500.) En fait pour les appareils quadripolaires ou à piégeage d'ions ce paramètre a moins d'intérêt. Les valeurs des pouvoirs de résolution sont petites. L'observation du signal brut que peut fournir un appareil de cette catégorie à partir d'un composé montre un tracé constitué de pics larges et de forme aplatie au sommet (fig. 16.15). Si Δm est constant et proche de $1u$, le pouvoir de résolution aura sensiblement pour valeur celle de la masse à laquelle on se place.

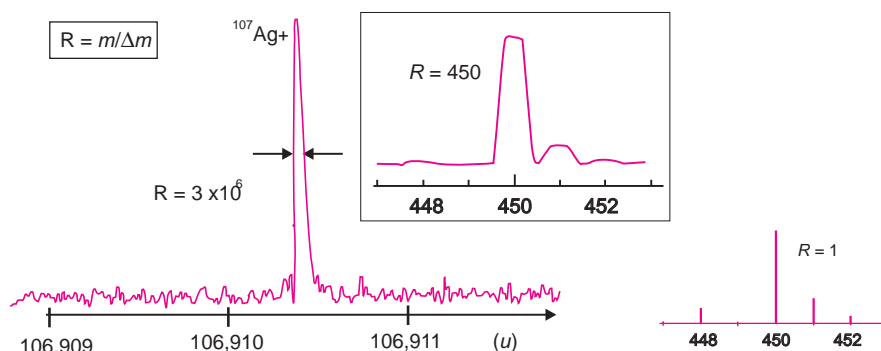


Figure 16.15 Pouvoir de résolution établi sur des spectres expérimentaux.

À gauche exemple d'un enregistrement correspondant à un pouvoir de résolution très élevé (appareil à résonance cyclotronique). Avec cette technologie qui fait appel aux transformées de Fourier, la résolution maximale théorique vaut : $R = \nu T/2$, (ν étant la fréquence en Hz de l'ion concerné, et T (s), le temps d'acquisition de l'interférogramme). Au centre le signal brut d'un appareil à filtre quadripolaire (pouvoir de résolution, 450). À droite présentation conventionnelle de ce même enregistrement (résolution, $1u$).

16.8.4 Introduction de l'échantillon

Les méthodes d'introduction des échantillons dans le spectromètre de masse sont nombreuses à la fois parce que les échantillons peuvent revêtir des formes variées et parce certains procédés d'ionisation ont leur propre exigence.

16.8.5 Introduction directe

Si l'échantillon est sous forme de gaz ou de liquide, on en introduit une très petite quantité, avec une microseringue, dans une sorte de réservoir qui communique avec la chambre d'ionisation par un orifice très étroit. Sous l'effet du vide poussé qui règne en aval de cet orifice, le composé se trouve aspiré et vaporisé. On obtient ce qu'on appelle une *fuite* (ou *pompage*) *moléculaire*. Pour les applications qui nécessitent un suivi permanent, l'introduction peut se faire en continu par une entrée en dérivation. Les gaz et les composés volatils (COV) à l'état vapeur ou dissous dans un liquide tel l'eau pourront diffuser par exemple à travers une membrane poreuse.

S'il s'agit d'un solide pouvant passer à l'état de vapeur sous vide, il est déposé à l'extrémité d'un support métallique (chauffé ou non) qui coulisse dans la source de l'appareil. Dans d'autres cas, pour certains modes d'ionisation, il est mélangé au sein d'une matrice (ex. glycérol ou acide benzoïque).

16.8.6 Introduction dans le cas des techniques couplées

Pour les mélanges de composés, il est fréquent de faire précéder l'analyse par spectrométrie de masse d'une séparation préalable des constituants par chromatographie en réunissant un chromatographe et un spectromètre de masse. Le couplage CPG/SM est devenu très courant : on fait déboucher la colonne capillaire dans la chambre d'ionisation. Les composés séparés arrivent donc sous forme gazeuse et mélangés au gaz vecteur pour être analysés tour à tour. Le débit de gaz vecteur ne dépassant pas 1 à 2 mL /min, la pompe du spectromètre suffit pour maintenir le vide nécessaire à l'analyse.

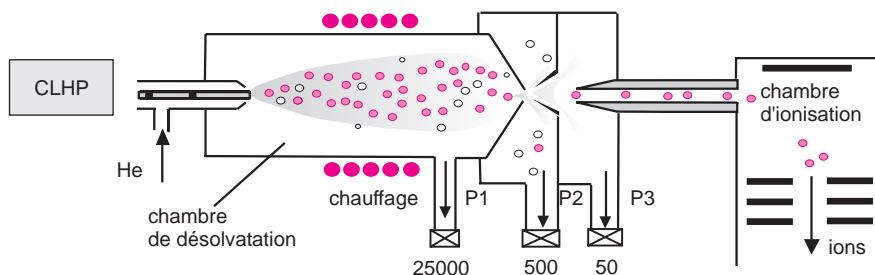


Figure 16.16 Interface CLHP/SM utilisant un séparateur à faisceau de particules. Les molécules lourdes, moins déviées par effet du vide que les molécules légères de solvant, ont une plus grande probabilité de rester dans l'axe du système et de passer ainsi dans la partie SM. Cette approche balistique a été très utilisée dans d'autres dispositifs maintenant abandonnés.

L'interfaçage CLHP/SM ou ECHP/SM est plus complexe par suite de la présence des solvants d'élution qui contiennent souvent de l'eau (un poison pour les spectromètres de masse). En ce qui concerne la chromatographie liquide on privilégie les micro-colonnes aux débits très faibles.

En CLHP, il peut s'agir de composés de masses moléculaires élevées, pour lesquels les modes d'ionisation sont différents. Un dispositif assez ancien, dont la sensibilité est maintenant jugée trop faible, est le *séparateur à faisceau de particules*, (ou *Particle beam*, figure 16.16), dans lequel la phase liquide est vaporisée sous forme de spray dans une chambre de désolvatation, avant de traverser un espace où l'échantillon continue à se concentrer par évaporation.

16.9 PRINCIPAUX PROCÉDÉS D'IONISATION SOUS VIDE

L'analyse par spectrométrie de masse débute par l'ionisation du composé en espèces individuelles entières ou fragmentées. Le choix de la méthode d'ionisation dépend de l'étude projetée, de la nature du composé qui peut être une petite molécule organique, un métal, une macromolécule biologique... et de son état (gaz, liquide ou solide). Les dispositifs correspondants sont complexes et souvent installés dès la construction du spectromètre, si bien que les appareils sont en fait spécialisés.

16.9.1 Ionisation par impact électronique (IE)

L'*ionisation par impact électronique* est la méthode la plus utilisée pour les composés qui peuvent passer à l'état gazeux. C'est notamment le cas des molécules organiques. Elle consiste à provoquer des collisions entre les molécules sans charges initiales et des électrons obtenus par effet thermo-ionique (fig. 16.17). Dans un choc il y a arrachement d'un des électrons les moins retenus de la molécule, ce qui conduit à un ion porteur d'une charge élémentaire positive.

Ce procédé est reproductible, ce qui permet d'identifier un composé en comparant son spectre à tous ceux d'une spectrothèque, du moins si elle contient le spectre de ce composé.

■ Par d'autres mécanismes il se forme aussi, en quantité moindre, des ions négatifs. Pour étudier ces derniers, il faut inverser les polarités des électrodes ainsi que le sens du courant dans l'électroaimant pour conserver aux ions la trajectoire imposée par construction.

L'énergie standard d'ionisation, 70 eV, est obtenue en accélérant les électrons par une ddp de 70 V. Il se produit environ un ion pour 10 000 molécules. C'est un procédé « très cassant ». Pour accroître l'intensité relative du pic moléculaire M, il est conseillé de choisir une énergie d'ionisation plus faible, 15 eV par exemple (fig. 16.18).

■ Pour préciser l'origine des ions, on utilise une terminologie variée et heureusement assez explicite par elle-même : c'est ainsi qu'on rencontrera des ions monochargés, polychargés, monoatomiques, polyatomiques, moléculaires, pseudomoléculaires, parents, fils, fragments, secondaires (issus de filiations après ionisation), métastables...

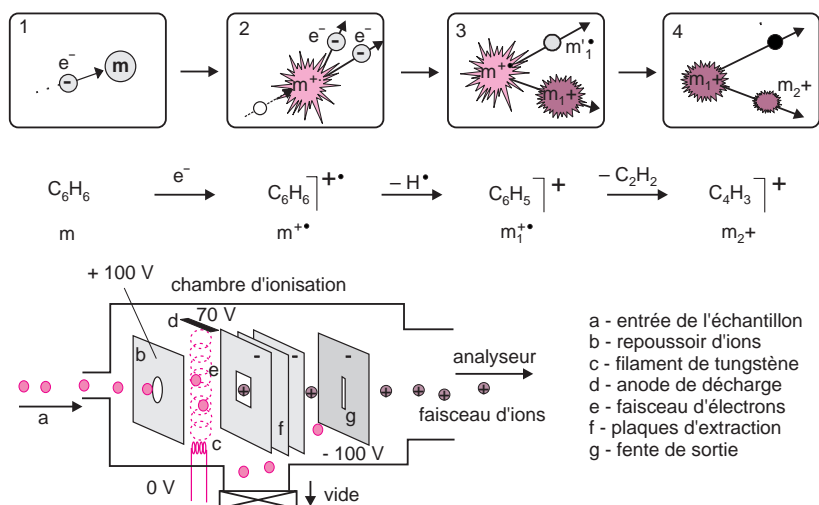


Figure 16.17 Ionisation électronique.

Impact d'un électron sur une molécule m , avec apparition de l'ion parent et d'ions secondaires m_1^+ et m_2^+ en filiation directe. Les fragments neutres, m_1' et m_2' , ne sont pas détectés. Illustration dans le cas du benzène. Schéma d'une chambre d'ionisation, encore appelée chambre de collision (ou source d'ions). En superposant un champ magnétique dirigé parallèlement aux électrons, ces derniers suivent un mouvement en spirale, qui améliore l'efficacité de ce canon à électrons.

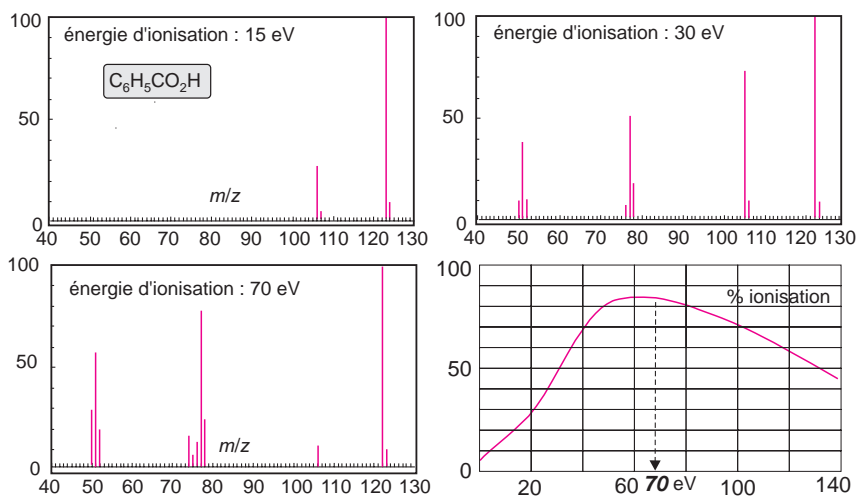


Figure 16.18 Influence de l'énergie des électrons sur la fragmentation.

Exemple de l'acide benzoïque. Courbe de l'efficacité de l'ionisation en fonction de l'énergie des électrons. On remarquera que les spectres sont normalisés c'est-à-dire que le pic le plus intense prend la valeur 100. Certains disent que c'est une application de la méthode de Procruste (selon la légende grecque, le brigand Procruste forçait les voyageurs à s'allonger sur un lit et selon leur taille il leur coupait les pieds ou au contraire tirait sur leurs membres pour les mettre aux dimensions du lit).

16.9.2 Ionisation chimique positive (IC)

Ce mode d'ionisation résulte de la réaction entre les molécules du composé M et des ions obtenus par bombardement d'électrons sur un gaz, tel le méthane, l'ammoniac ou l'isobutane, introduit conjointement au composé dans la source de l'appareil. La pression relativement élevée qui règne dans cette partie de l'appareil (une centaine de pascals), réduit le libre parcours moyen des molécules, ce qui favorise les collisions. Il s'agit d'un procédé d'ionisation « doux ».

Il se produit des espèces positives et négatives. On observe en particulier la formation de l'ion pseudomoléculaire $MH^+]$ (qui n'est pas un ion radical). Sa formation dépend cependant de l'affinité de M pour H^+ . Cet ion a une moindre tendance à se fragmenter que l'ion moléculaire $M^{+\bullet}$ obtenu par impact électronique, ce qui permet de repérer la valeur de M (fig. 16.19).

Cependant pour les composés du type RH, on peut observer également l'ion R^+ si bien que l'ionisation chimique laisse toujours planer un doute sur la valeur de la masse moléculaire du composé étudié.

$NH_4]^+$ se comporte comme $CH_5]^+$. Quant à l'isobutane, il donne avec facilité l'ion $(CH_3)_3C]^+$, stable, qui conduit à l'ion $(M+1)$, en se transformant lui-même en isobutène.

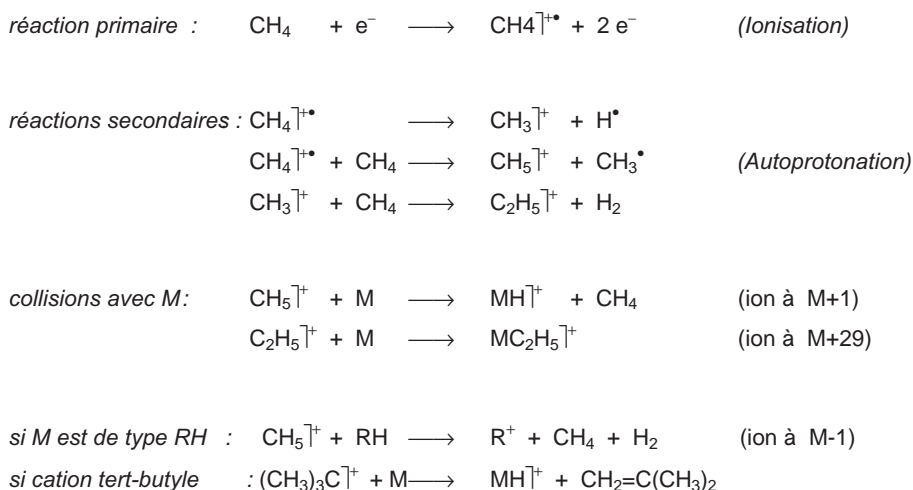


Figure 16.19 Ionisation chimique.

Formation à partir du méthane d'espèces cationiques et réaction sur les molécules M du composé. La dernière équation correspond à l'action du cation de l'isobutane. La présence d'ions relativement lourds dans ces milieux rend sans intérêt l'étude du spectre en dessous de 45 Da.

16.9.3 Bombardement par atomes rapides (FAB)

Ce procédé et les suivants sont réservés aux composés polaires et peu volatils sous vide. L'ionisation se fait par impact d'atomes lourds non ionisés (Ar ou Xe), animés d'une grande vitesse, sur l'échantillon dispersé au préalable dans une matrice liquide peu volatile (glycérol ou diéthanolamine) et déposé dans la source à l'extrémité d'un support.

Pour disposer de ces projectiles, on commence par ioniser un gaz tel l'argon avec des électrons. Ces ions primaires sont alors dirigés vers une chambre de collision où ils viennent frapper des atomes de ce même gaz à l'état neutre (fig. 16.20) avant d'être éliminés du faisceau principal par l'effet défecteur d'un champ électrique. Ce sont ces atomes neutres et rapides qui viennent bombarder l'échantillon. Cette technique dénommée *FAB* (*fast atom bombardment*), provoque accessoirement l'apparition d'ions dus à la matrice de dispersion et d'un bruit de fond assez important ce qui rend impossible l'étude des ions de petite masse.

Apparentée à la technique FAB, le bombardement de la cible avec des ions Cs^+ ou Ar^+ à la place des atomes neutres a reçu le nom de technique SIMS. Ces ions qui peuvent être accélérés permettent des fragmentations plus énergétiques.

16.9.4 Ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

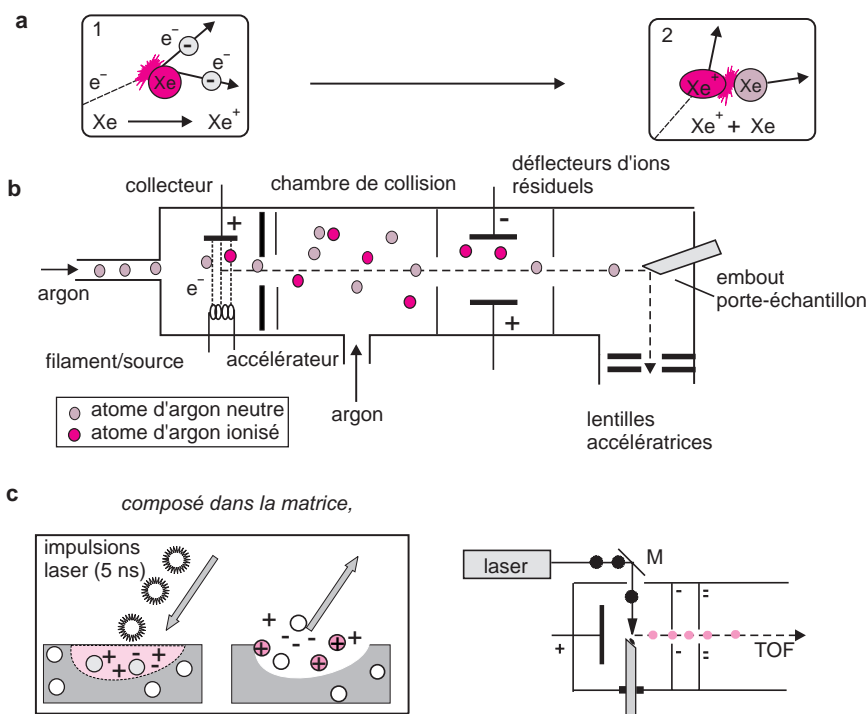


Figure 16.20 Techniques FAB et MALDI.

a) Principe de formation d'un atome rapide et neutre de xénon par collision; b) formation d'atomes rapides d'argon dans une chambre de collision et bombardement de l'échantillon (canon FAB); c) ionisation par laser (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation*). L'impact du photon est comparable à celui d'un atome lourd. Par un mécanisme mal connu il se produit une désorption et photo-ionisation des molécules. Ces modes d'ionisation par tirs laser conviennent particulièrement bien à l'étude des masses moyennes et élevées. Ils sont utilisés surtout en biochimie et non pas pour effectuer des dosages de routine.

Ce mode d'ionisation-désorption provoque très peu de fragmentations. Le composé à étudier est d'abord incorporé dans une matrice organique solide (de l'acide dihydroxybenzoïque, par exemple) et ensuite déposé sur un support au point d'impact d'un faisceau laser

pulsé UV (ex. laser N_2 , $\lambda = 337$ nm, 5 ns). L'énergie thermique reçue est transférée par la matrice au composé qui se trouve désorbé et ionisé de façon douce (fig. 16.20c). Par ce procédé on extrait de la phase condensée des ions en phase gazeuse.

Ce mode d'ionisation pulsé est particulièrement bien adapté aux appareils à temps de vol pour étudier les biomacromolécules, sachant qu'il donne des ions porteurs d'une seule charge contrairement aux techniques à pression atmosphérique (voir paragraphe suivant). Les petites molécules ($M < 500$ u) sont difficiles à étudier par ce procédé à cause des ions produits par la décomposition de la matrice. D'autres supports à base de silicium poreux par exemple sont utilisés : ils évitent de recourir à une matrice et autorisent donc l'étude des petites molécules.

16.10 PROCÉDÉS D'IONISATION À PRESSION ATMOSPHÉRIQUE

Beaucoup d'applications nouvelles en spectrométrie de masse concernent soit des dosages d'éléments soit l'étude de biomolécules peu stables et polaires ($M > 2\,000$ Da). Ces applications ont été rendues possibles avec la mise au point de plusieurs dispositifs et méthodes d'ionisation à pression atmosphérique (API) applicables aux composés en solution après nébulisation.

16.10.1 Ionisation par plasma d'argon

On sait que les plasmas d'argon sont utilisés en spectrométrie d'émission optique (cf. 14.3.1) pour faire passer les éléments sous forme de cations dans des états excités à l'origine de raies ioniques. Il n'est pas étonnant, par conséquent, qu'on fasse appel à ces mêmes plasmas pour ioniser des échantillons inorganiques en spectrométrie de masse.

L'échantillon en solution est nébulisé dans le plasma formé à proximité d'un petit orifice situé à l'entrée de l'analyseur, ce qui permet à une partie des ions formés de pénétrer par l'effet du vide dans le spectromètre de masse (fig. 16.21). On peut placer également un plasma en sortie de colonne capillaire d'une CPG. Toutes les liaisons chimiques sont détruites, ce qui fait qu'on accède ainsi aux concentrations élémentaires (*analyse de spéciation* des composés organométalliques par exemple).

■ Dans les plasmas d'argon subsistent à de très faibles concentrations des ions polyatomiques provenant de l'air, de l'argon ou de la matrice de l'échantillon. Ces espèces peuvent être isobariques avec les analytes et sont la source de confusions possibles avec les appareils de faible résolution. N_2 , O_2 , ArH , ClO , ArO , CaO , Ar_2 ..., ces ions moléculaires choisis comme exemples ont le même rapport m/z que des éléments tels Si, S, V, Fe, K, qui peuvent être les espèces recherchées. Deux méthodes sont utiles dans ce cas. On pourra soit choisir un isotope de l'élément considéré (^{54}Fe au lieu de ^{56}Fe) ou bien on utilisera un spectromètre comportant une chambre de collision située entre la source et le détecteur, pour dissocier les ions polyatomiques.

16.10.2 Ionisation par l'intermédiaire de sprays

Généralement placés en sortie d'un appareil d'électrophorèse capillaire ou de chromatographie liquide à microcolonne, ces procédés très sensibles, commencent par transformer la

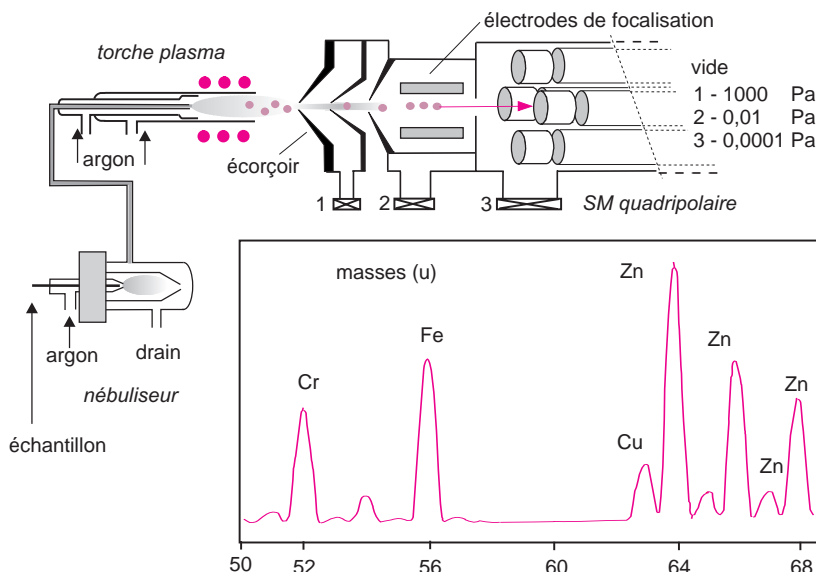


Figure 16.21 Ionisation par torche plasma et enregistrement obtenu par la méthode ICP/SM.

Une partie des ions générés dans le plasma horizontal passe dans le spectromètre de masse. Mélange de quelques éléments métalliques enregistré entre les masses 50 et 68 Da. On notera la présence des différents isotopes des éléments concernés. La résolution est ici insuffisante pour distinguer les isobares, c'est-à-dire des ions provenant d'éléments différents mais ayant pratiquement même masse et qui se superposent donc sur le graphe.

phase mobile liquide en un fin brouillard aqueux contenant l'espèce à analyser. La phase mobile peut apporter des ions H^+ , selon le pH de la solution et contenir des cations tels NH_4^+ , Na^+ , K^+ (cas d'un électrolyte).

Plusieurs techniques sont à distinguer :

- **Electrospray ou « Ionspray » (ESI).** Les gouttelettes sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire de silice, métallisé en surface et porté à un potentiel élevé positif (si l'on a choisi d'étudier les ions positifs). Le champ électrique intense leur confère une densité de charge (z/m) importante (fig. 16.22). Par effet d'un gaz sec, elles s'évaporent progressivement en perdant des molécules de solvant par des mécanismes complexes de désolvatation et d'évaporation. Leur densité de charge devenant trop grande (limite de Rayleigh), elles explosent en libérant des ions non fragmentés et protonés ou « cationisés » de l'analyte, porteurs d'un nombre de charges variables (en moyenne 1 charge élémentaire pour 1 000 Da en masse).
- **Photoionisation.** On associe le mode de nébulisation décrit précédemment avec une ionisation au moyen de photons d'environ 10 eV. Le montage comporte à la place de la pointe à effet corona une lampe UV, ce qui rappelle le détecteur à photoionisation (cf. 2.7.5). Ce procédé qui donne peu de fragments est intéressant pour les molécules peu polaires.
- **Ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI).** Les micro-gouttes sortant de la buse sont concentrées par un chauffage très court vers 350 °C avant d'arriver dans une zone où se trouve un gaz tel le diazote et de la vapeur d'eau qui ont été ionisés par des

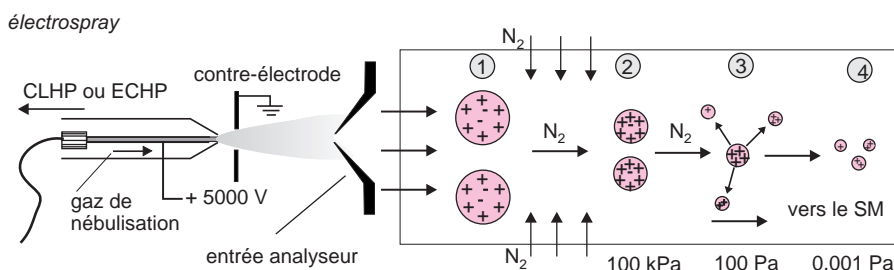


Figure 16.22 Ionisation à pression atmosphérique par electrospray (« ionspray »).

Le capillaire de sortie porté à un potentiel élevé, conduit à un brouillard chargé (1). Les gouttelettes, en s'évaporant, provoquent une augmentation de la densité de charges électriques (2) au point qu'elles explosent en expulsant des molécules de l'analyte portées de plusieurs charges (3). Le diazote améliore le processus de concentration (4).

décharges corona (fig. 16.23). Il se produit des collisions nombreuses ions/molécules avec transferts d'électrons et de protons. Cette méthode conduit à des ions multichargés de type $(M + nH)^{n+}$. Elle ne peut être miniaturisée, car elle demande un débit plus grand que l'electrospray et ne peut convenir qu'aux molécules volatiles et thermiquement stables de masse inférieures à 1 000 Da.

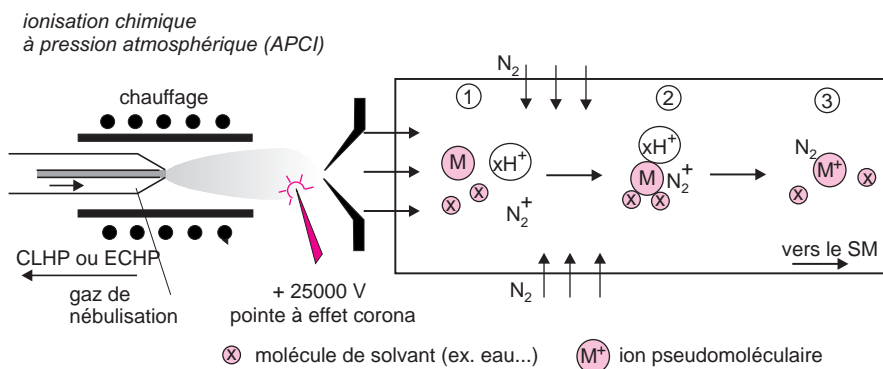


Figure 16.23 Ionisation à pression atmosphérique par ionisation chimique.

(1), L'échantillon sous forme de spray, se mélange aux ions issus d'un gaz réactant tel le diazote ionisé par une aiguille portée à un potentiel très élevé (effet corona). (2) Les molécules ionisées de diazote ou de solvant captent à leur tour des molécules d'analyte pour conduire à des amas (« clusters ») (3). Ceux-ci sont détruits par un courant de diazote qui permet un transfert des charges sur l'analyse.

L'avantage de ces méthodes d'ionisation douces est l'obtention d'ions multichargés (z peut dépasser 30), pseudomoléculaires, formés *avant d'entrer* dans le spectromètre. Mis à part l'APCI, elles ont permis d'étendre la gamme de masse des appareils jusqu'à 10^5 Da (ex. protéines, polysaccharides et autres polymères).

Ces procédés conduisent à des spectres présentant le phénomène « d'enveloppe ionique » qui permet de calculer la masse moléculaire (fig. 16.24)

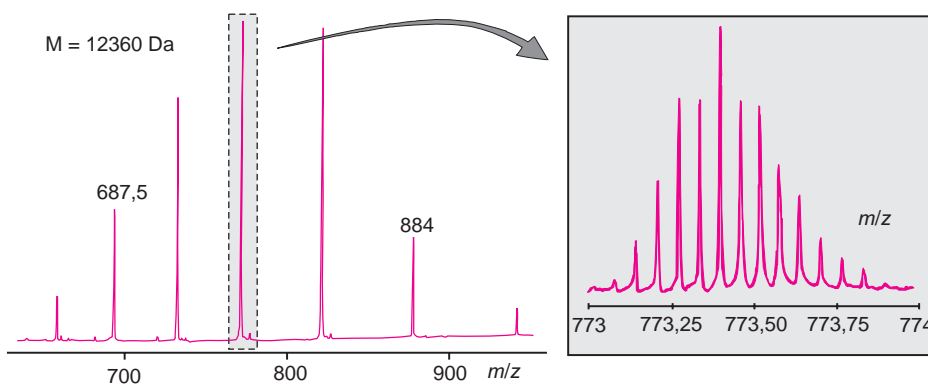


Figure 16.24 Ions moléculaires multichargés.

Spectre obtenu à partir du cytochrome C (cœur de cheval), protéine de 12 360 Da, par la méthode électrospray. Entre 2 pics consécutifs, la charge de l'ion varie d'une unité. À droite, amas isotopique du cytochrome en haute résolution. On peut retrouver à partir de ces spectres par deux méthodes indépendantes des valeurs très proches de la masse moléculaire ainsi que le nombre de charges portées par les ions (avec l'autorisation de F.W. McLafferty, et Coll. *Anal. Chem.* 1995, **67**, 3802-3805).

16.11 SPECTROMÈTRES DE MASSE EN TANDEM (MS/MS)

Pour obtenir des informations plus précises sur la structure des ions fragments issus de la décomposition des composés moléculaires introduits, on fait appel à des spectromètres de masse comportant au minimum deux analyseurs en série. Il ne s'agit pas de la mise bout à bout d'appareils distincts, mais de l'association dans un appareil hybride soit d'un secteur magnétique suivi d'un quadripôle, soit de deux quadripôles, soit d'un TOF avec un second quadripôle (ou l'inverse). Entre les deux analyseurs est placée une chambre de collision (fig. 16.25). Il existe plusieurs façons d'utiliser de tels appareils.

- Une première technique consiste à sélectionner les ions correspondant à un rapport m/z choisi au moyen du premier analyseur qui joue ainsi le rôle d'un filtre. Ces ions traversent ensuite la chambre de collision (*CID*, *Collision Ionic Dissociation*) dans laquelle on fait arriver un gaz (hélium, argon ou diazote). Il s'ensuit de nouvelles décompositions. Les ions fils de fragmentation poursuivent leur course vers le second analyseur, utilisé en mode normal, ce qui conduit à un spectre donnant des informations de structure de l'ion m/z sélectionné en amont, à l'exclusion des autres ions formés dans la source de l'appareil (*recherche de filiations*).
- Dans une autre technique on règle le second analyseur pour qu'il ne laisse passer que les ions d'un même rapport m/z et on fait un balayage des masses avec le premier analyseur. On repère ainsi tous les ions donnant le même fragment (*recherche des parents*).
- Enfin on peut faire un double balayage synchrone des deux analyseurs avec un décalage correspondant à une masse donnée (ex. un fragment neutre tel CO ou C₂H₂). On repérera alors les ions de la source qui se décomposent en éliminant le fragment en question (*recherche des neutres*).

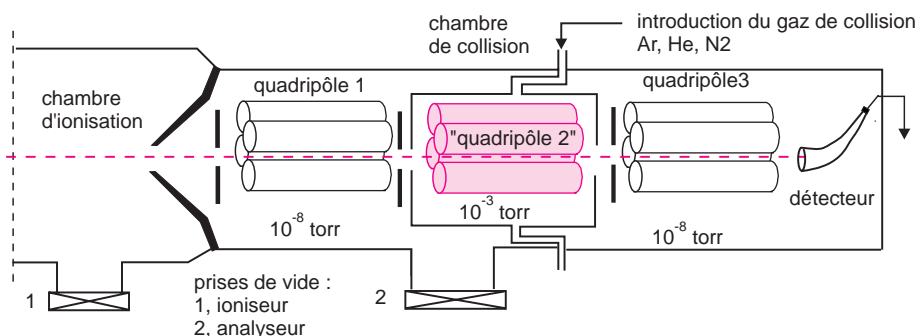


Figure 16.25 Principe d'un appareil SM/SM à 3 quadripôles en série.

Dans ce montage appelé QQQ, le quadripôle central a un simple rôle focalisateur. Situé dans la chambre de collision, il est alimenté par une tension alternative uniquement (absence de tension continue). La pression à cet endroit de l'appareil est plus élevée. Avec ces instruments on peut étudier des mélanges comme on le ferait avec la technique CPG/SM. Les applications sont devenues très nombreuses sachant que les coûts de ces appareils ont beaucoup diminué.

16.12 DÉTECTEURS À IONS

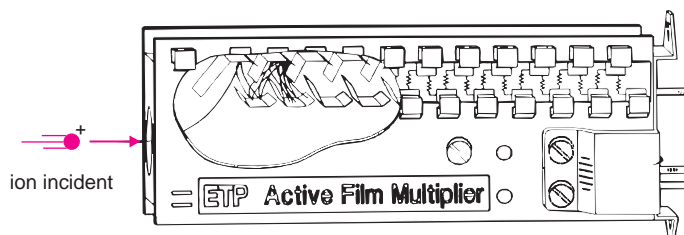
La détection en spectrométrie de masse est basée sur la mesure des charges transportées par les ions. Ordinairement le nombre d'ions individuels d'une même espèce est très grand, de sorte que le signal est de type analogique, mais certains modèles ont un tel pouvoir d'amplification qu'ils peuvent repérer l'impact d'un seul ion.

■ Pour l'exploitation quantitative des spectres, il faut s'assurer que le nombre d'ions détectés reflète le nombre d'ions produits, quel que soit l'endroit du spectre considéré. Si l'enregistrement est obtenu par un balayage en champ magnétique, la vitesse d'incrémentation du champ ne doit pas être constante. La formule de déflexion montre que le champ intervient au carré.

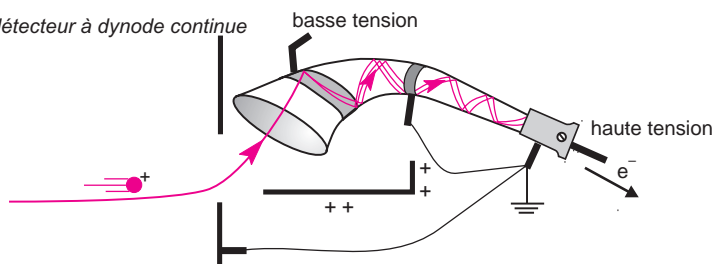
On distingue :

- *les multiplicateurs d'électrons à dynodes séparées*. Les ions positifs frappent une cathode de conversion qui libère des électrons qui sont ensuite « multipliés » par une vingtaine de dynodes placées en cascade (fig. 16.26). Ces détecteurs sont très sensibles. Le gain atteint 10^8 . De nouveaux revêtements à base d'alumine sur les dynodes ont amélioré les performances des matériaux traditionnels (Cu/Be) qui vieillissaient assez mal dans l'atmosphère résiduelle des spectromètres, ou lors des périodes d'arrêt (retours à la pression atmosphérique).
- *les multiplicateurs d'électrons à dynode continue (channeltron®)*. Les ions sont déviés vers un collecteur dont l'entrée, en forme de cornet, est constituée d'un verre dopé au plomb qui fait office de cathode de conversion. Les électrons libérés sont attirés vers une électrode positive (fig. 16.26). Les chocs successifs des électrons sur les parois provoquent leur multiplication, comme sur des dynodes séparées. Le montage est désaxé par rapport à la trajectoire incidente des ions pour préserver la partie sensible du détecteur de l'impact des espèces neutres ainsi que des photons émis par le filament, susceptibles également d'arracher des électrons.

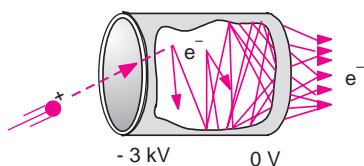
a détecteur à dynodes séparées



b détecteur à dynode continue



c un canal multiplicateur d'électrons



d multiplicateur à galette (diam. 20-100mm)

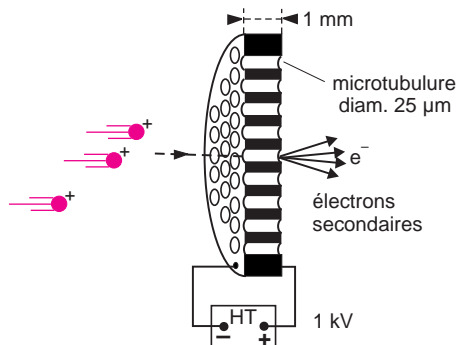


Figure 16.26 Détecteurs en SM.

a) Modèle à dynodes séparées à film actif (reproduit avec l'autorisation de la société ETP Scientific Inc.); b) modèle à dynode continue. Représentation d'un channeltron : la forme en entonnoir de la cathode permet la récupération des ions issus de trajectoires légèrement différentes. La courbure a pour effet d'éviter que des ions positifs formés par impact des électrons sur des molécules résiduelles, ne prennent trop d'accélération avant de frapper à nouveau la cathode et ne génèrent ainsi d'autres électrons (feedback du channeltron); c) détail de la cathode de conversion. Multiplication des électrons dans un microcanal; d) un multiplicateur à galette. Système de collecteur multicanaux (microchanneltron) qui permet de localiser l'impact des ions (d'après illustrations de Galileo USA).

► **les détecteurs à microcanaux.** Constitués par la réunion d'un très grand nombre de microchanneltrons disposés en nid-d'abeilles, ils correspondent à une sorte de plaque photographique électronique. Chaque détecteur est formé d'une portion de microtube ($25\ \mu\text{m}$

de diamètre) enduit intérieurement d'un matériau semi-conducteur fonctionnant à la manière d'une dynode continue (fig. 16.26). L'avalanche des électrons secondaires émis est récupérée par une anode. Ce système permet d'enregistrer simultanément des ions de masses différentes.

■ Les plaques photographiques des premiers spectrographes sont abandonnées, parce qu'il s'agit d'une méthode lente, ayant une reproductibilité aléatoire et une non-progressivité du rendu par l'émulsion de l'abondance des ions (dynamique et contrastes limités). Son principe demeure cependant attractif puisqu'il s'agit d'une méthode d'enregistrement simultanée. Les spectrographes à ionisation par étincelles de type Mattauch-Herzog ont longtemps conservé ce procédé.

■ À l'issue de ce bref panorama des cinq catégories d'analyseurs, on peut se demander si tous conduisent, à partir d'un même composé, à des spectres de masse identiques. En fait il n'y a pas d'analyseur universel. Chaque type offre des potentialités propres. Certains appareils analysent les ions sitôt formés tandis que d'autres commencent par les stocker et amortissent leurs mouvements par des chocs faisant souvent croître anormalement le pic $M+1$. Pour cette raison, la spectrométrie de masse tient une place à part comparativement aux méthodes spectrales optiques qui sont des procédés passifs d'étude. Il est donc indispensable de standardiser les conditions d'examen, grâce à quoi les spectres deviennent comparables.

QUELQUES APPLICATIONS EN SPECTROMÉTRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse est le secteur le plus dynamique de l'industrie analytique. Elle a d'innombrables applications sachant que les appareils peuvent être utilisés comme simples détecteurs en association avec les méthodes séparatives (chromatographie, électrophorèse), pour faire des analyses élémentaires, isotopiques, trouver les formules empiriques ou élucider les structures des composés organiques et même maintenant devenir indispensable dans les domaines de la génomique et de la protéomique. Les pages suivantes se rapportent à quelques applications simples de la spectrométrie de masse.

16.13 IDENTIFICATION AU MOYEN D'UNE SPECTROTHÈQUE

L'identification des composés par comparaison de spectres est utilisée dans de nombreux domaines de l'analyse. Plusieurs algorithmes permettent de rechercher à partir d'une spectrothèque où sont encodés les principaux pics de produits connus, quels sont ceux présentant le meilleur accord avec celui que l'on veut identifier. Généralement la recherche est divisée en trois stades :

- *réduction des données.* Le spectre de fragmentation du composé est ramené à 16 pics au maximum, en donnant la préférence aux pics lourds, plus significatifs que les pics légers. De même, chaque spectre en bibliothèque est réduit à 8 pics.
- *prérecherche.* On sélectionne les spectres réduits de la spectrothèque, ayant des pics aux mêmes positions que dans le spectre réduit du composé, même si l'intensité est différente.

► *recherche principale.* Enfin la sélection précédente est reprise par un algorithme plus fin, qui, à partir de critères de choix faisant intervenir intensité, masse et rareté du pic, affecte un indice de 0 à 1 000 (identité) à chaque spectre, ce qui permet de les classer par similarité décroissante. En modifiant les critères de choix, on peut évidemment affiner la recherche en procédant par recoupements entre divers classements.

Ce procédé est devenu d'usage courant. La spectrothèque NIST (*National Institute of Standards and Technology*) comporte actuellement plus de 250 000 spectres.

La spectrométrie de masse est devenue un maillon de la protéomique car elle permet de retrouver en association avec les méthodes dégradatives les enchaînements des acides aminés qui constitue le squelette des protéines. En associant l'électrophorèse bidimensionnelle comme moyen de séparation on dispose actuellement d'un outil très performant pour déterminer les masses de ces biomacromolécules. Avec une installation MALDI-TOF qui conduit majoritairement à des ions porteurs d'une seule charge et qui fragmente les peptides en rompant les liaisons CO-NH reliant les résidus des différents acides aminés, il est possible d'identifier le peptide d'origine à partir du séquençage de ces acides aminés. Cette approche peut être associée à des procédés de dégradation chimique ou enzymatiques (tryp-sine) effectués préalablement.

16.14 ANALYSE DE LA COMPOSITION ÉLÉMENTAIRE DES IONS

16.14.1 Méthode basée sur les spectres haute résolution

Avec un spectromètre de masse dont le pouvoir de résolution est d'au moins 10 000, et moyennant certaines hypothèses il est possible de trouver la formule empirique d'un ion moléculaire ou d'un fragment. Pour cela l'appareil calcule à partir des masses isotopiques exactes des éléments supposés être présents, toutes les formules empiriques qui peuvent correspondre à la masse expérimentale en tenant compte de sa marge d'erreur (voir par ex. tabl. 16.1).

Pour sélectionner la bonne formule empirique, le logiciel accompagne chacune d'elle de la valeur de son indice d'insaturation (I). Celui-ci exprime le nombre de liaisons multiples et de cycles de l'ion correspondant (expression 16.20). Si I est un entier, il s'agit d'un cation radical, et si I est un demi-entier, il s'agit d'un cation. En général un ion à nombre impair d'électrons se fragmente par perte d'un radical. Il devient donc un cation à nombre pair d'électrons. Plus rarement il peut se fragmenter par un processus de réarrangement, et demeurer un cation radical.

En associant quelques autres considérations, telle la règle de l'azote (si le composé comporte un atome d'azote, sa masse est impaire), la composition isotopique des éléments, on parvient à trouver la nature des principaux ions présents sur le spectre.

$$I = 1 + \left[0,5 \times \sum_1^i N_i (V_i - 2) \right] \quad (16.20)$$

N_i représentant le nombre d'atomes de l'élément i , dont la valence est V_i .

Tableau 16.1 Masses atomiques des isotopes des principaux éléments rencontrés en chimie organique.

Elément	Masse nominale	masse atomique (g)	Nucléide (%)	Masse (u)
Hydrogène	1	1,00794	^1H (99,985)	1,007825
			^2H (0,015)	2,014102
Carbone		12,01112	^{12}C (98,90)	12,000000
			^{13}C (1,10)	13,003355
Azote	14	14,00674	^{14}N (99,63)	14,003074
			^{15}N (0,37)	15,000108
Oxygène	16	15,99940	^{16}O (99,76)	15,994915
			^{17}O (0,04)	16,999131
			^{18}O (0,20)	17,999160
Fluor	19	18,99840	^{19}F (100)	18,998403
Soufre	32	32,066	^{32}S (95,02)	31,972071
			^{33}S (0,75)	32,971458
			^{34}S (4,21)	33,967867
Chlore	35	35,45274	^{35}Cl (75,77)	34,968853
			^{37}Cl (24,23)	36,965903

La **masse nominale d'un élément** est la masse entière de son isotope naturel et stable le plus abondant. La **masse nominale d'un ion** est la somme des masses nominales des atomes présents dans sa formule empirique (ex. $\text{HCl}^+ = 36 \text{ u}$).

16.14.2 Méthode basée sur les abondances isotopiques

Cette autre méthode est exploitée pour trouver la formule empirique du composé analysé. Un appareil dont le pouvoir de résolution est modeste suffit. Le principe repose sur la composition isotopique des éléments qui sont presque tous constitués de plusieurs isotopes. Pour cette raison tout échantillon d'un composé moléculaire (constitué d'une immense population de molécules individuelles) donne en spectrométrie de masse plusieurs pics moléculaires (un *amas isotopique* à M , $M + 1$, $M + 2$, etc.), dont les intensités relatives sont une signature pour chacun d'eux. Il s'agit donc de comparer l'aspect de cet ensemble de signaux, présenté sous forme de bâtonnets et obtenu à partir du composé, avec tous les ensembles calculés *a priori* avec des formules empiriques différentes, en se limitant à celles qui satisfont aux informations sur le composé pour éliminer les calculs inutiles.

■ Soit un échantillon de benzène C_6H_6 ($M = 78$). Sachant que pour 100 atomes de carbone, il y a environ un atome de ^{13}C , on peut prévoir qu'environ 6 % des molécules de benzène posséderont un atome de ^{13}C dans leur squelette, et auront donc pour masse 79 (la contribution de 2H (ou D, 0,01 % est très faible). Le petit pic que l'on observe à $m/z = 79$ sur le spectre de masse de ce composé en est la conséquence. De même l'intensité du pic $m/z = 80$ sera due à la présence des molécules qui comportent soit deux ^{13}C , soit deux D, soit un ^{13}C et un D.

Le lecteur pourra retrouver les deux expressions approchées 16.21 et 16.22, utilisées pour calculer les intensités des pics $M+1$ et $M+2$ des composés ne comportant que les éléments C, H, N, O, F, P (nC , nN , etc. symbolisent le nombre d'atomes de carbone, d'azote, etc.) :

$$(M+1)\% = 1,1 nC + 0,36 nN \quad (16.21)$$

$$(M+2)\% = nC(nC-1) \times 1,12/200 + 0,2 nO \quad (16.22)$$

Cette méthode est devenue courante d'emploi mais son efficacité est assez limitée.

16.14.3 Recherche de la masse moléculaire à partir des ions polychargés

Des ions polychargés sont obtenus à partir des macromolécules lorsqu'elles sont ionisées en faisant appel aux sprays (ESI, APCI). Il est possible d'accéder à leurs masses moléculaires par une méthode alternative au procédé indiqué dans la figure 16.24. Pour faire ce calcul on doit disposer d'un spectre brut présentant une succession de pics moléculaires qui diffèrent par le nombre de charges portées.

On repère sur l'enregistrement du composé dont la masse est désignée par M , 2 pics consécutifs M_1 et M_2 . Leurs charges globales z_1 et z_2 diffèrent donc d'une unité : $z_2 = z_1 - 1$ (fig. 16.27). On peut donc écrire les relations 16.23 et 16.24 :

$$M_1 = \frac{M}{z_1} \quad (16.23)$$

$$M_2 = \frac{M}{z_2} \quad (16.24)$$

Un calcul simple permet de déduire pour z_1 :

$$z_1 = \frac{M_2}{M_2 - M_1} \quad (16.25)$$

Ensuite connaissant z_1 (arrondi à l'entier le plus proche) on calculera M (Da) à partir de 16.23.

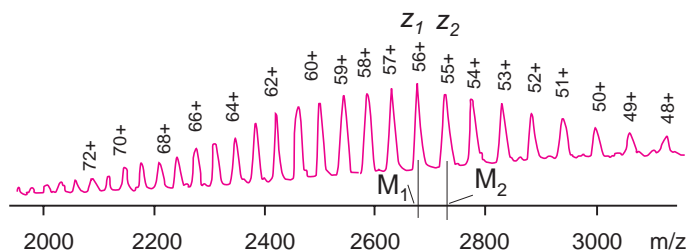


Figure 16.27 Spectre profil d'un anticorps de masse moléculaire élevée.

Ce spectre a été obtenu par électrospray. Sans utiliser les valeurs des charges reportées au-dessus de chaque signal, le calcul décrit dans le texte conduit à partir des seules valeurs de $M_1 = 2\,680$ et de $M_2 = 2\,729$ à $M = 150\,080$ Da.

16.15 MESURE DES RAPPORTS ISOTOPIQUES D'UN ÉLÉMENT

L'analyse de la composition isotopique par spectrométrie de masse permet de reconnaître la provenance géographique de certains composés organiques d'origine végétale ou de composés minéraux, ou bien encore d'améliorer la précision de certaines méthodes de datation basées sur la radioactivité, grâce à cette « signature isotopique ».

■ Dans le règne vivant, les isotopes d'un même élément peuvent être différenciés par les voies de biosynthèse suivies. En outre, ils traversent les parois cellulaires à des vitesses légèrement différentes. Ainsi le rapport isotopique $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ de la vanilline naturelle est plus faible que celui de la vanilline de synthèse ; il en est de même du glucose, dont ce rapport varie selon le cycle biologique suivi par la plante. La détection de la falsification des huiles de table, des arômes, des jus de fruits, l'étude du métabolisme des plantes et de nombreuses applications médicales, constituent autant d'exemples dans ce domaine.

Pour évaluer les variations du rapport $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, on le compare à un standard universellement adopté. Il s'agit d'un carbonate de calcium en provenance de Pee Dee (USA), dont l'abondance en ^{13}C est très élevée (rapport isotopique : $1,12372 \times 10^{-2}$). Expérimentalement on se base sur les intensités des pics de $^{13}\text{CO}_2$ (45) et $^{12}\text{CO}_2$ (44) obtenus par combustion de l'échantillon. On accède ainsi à l'écart relatif en millième, δ , du composé. Sa valeur est généralement négative.

$$\delta_{0/00} = 1\,000 \left[\frac{\left[\frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2} \right]_{\text{éch.}}}{\left[\frac{^{13}\text{CO}_2}{^{12}\text{CO}_2} \right]_{\text{réf.}}} - 1 \right] \quad (16.26)$$

■ Cette mesure étant effectuée après combustion, les variations isotopiques au niveau des différents sites du composé analysé ne sont pas accessibles. Pour cette raison, on préfère comparer le rapport D/H par RMN du deutérium, car il permet de comparer chaque site de la molécule étudiée.

Lorsqu'on est en présence d'un mélange de deux espèces A et B dont les variations isotopiques sont respectivement δ_A et δ_B , la valeur expérimentale du mélange, δ_M , résulte de la combinaison pondérée de δ_A et de δ_B , ce qui conduit aux pourcentages de A et B. En désignant par x la fraction de B et par $(1-x)$ la fraction de A, on aboutit à la relation 16.27 :

$$\begin{aligned} \delta_M &= (1-x) \delta_A + x \delta_B \\ x &= \frac{\delta_M - \delta_A}{\delta_B - \delta_A} \end{aligned} \quad (16.27)$$

La précision des mesures doit être très grande. La combustion nécessaire à la préparation de l'échantillon peut être faite immédiatement avant l'injection dans le spectromètre de masse. Il existe des appareils qui associent, *en ligne*, un chromatographe en phase gazeuse, un four tubulaire de combustion contenant de l'oxyde cuivrique (porté à $800\text{ }^\circ\text{C}$) et un spectromètre à secteur magnétique basse résolution, comportant un multicollecteur d'ions pour un repérage individuel de chaque masse (fig. 16.28).

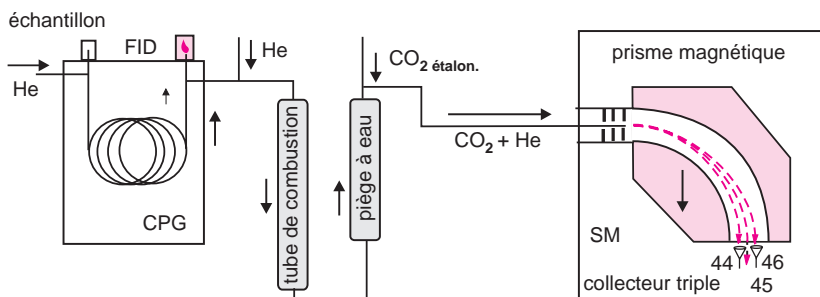


Figure 16.28 Ensemble d'analyse des rapports isotopiques.

La très grande sensibilité requise pour ces instruments est rendue possible par l'installation de plusieurs détecteurs du type Faraday, dont chacun ne recueille qu'une seule masse, après séparation en amont des ions par le secteur magnétique. Un composé d'étalonnage connu est co-injecté avec le produit à étudier.

■ **Accélérateurs-Spectromètres de masse (AMS)** — La mesure précise des rapports isotopiques pour les isotopes très peu présents est au-delà des possibilités des spectromètres de masse conventionnels, même s'ils sont spécialement adaptés à ces mesures. Pour les isotopes à l'état de traces infinitésimales, il existe, à l'échelon mondial, une cinquantaine de spectromètres de masse en tandem, dérivés des accélérateurs de particules type Van de Graaff, utilisables pour ces analyses : les tendetrons.

L'échantillon, qui doit être sous forme solide, est tout d'abord bombardé par des ions césium. Un premier spectromètre de masse extrait les ions négatifs correspondant à la masse sélectionnée. Ensuite, pour éliminer les interférences (isobares), les ions sont accélérés par une ddp de plusieurs mégavolts vers l'extrémité positive d'un accélérateur. Sur leur parcours, les ions entrent en collision avec une cible (solide ou gaz) afin qu'il ne subsiste, au-delà, que des atomes isolés porteurs de plusieurs charges positives. Les mesures de concentration exigent de comparer en alternance, les signaux des différents isotopes, en provenance de l'échantillon, des standards ou des blancs analytiques.

Ainsi la datation des objets anciens par la concentration en ^{14}C est-elle devenue beaucoup plus précise et sensible, que la méthode classique de Libby, faisant appel aux mesures de radioactivité.

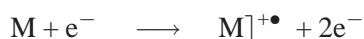
16.16 FRAGMENTATION DES MOLÉCULES ORGANIQUES

L'interprétation d'un spectre de masse — nature et origine des pics de fragmentation — est un exercice difficile mais d'un grand intérêt. Le chimiste organicien retrouve des types d'ions connus ou envisagés pour expliquer les mécanismes réactionnels en phases condensées. La différence tient ici à ce que les ions se déplacent dans le vide et sans collisions. Les intervalles de temps entre formation et détection des ions étant très brefs, on peut envisager l'existence d'espèces très instables dont la durée de vie n'excède pas 1 μs .

Règles de base

La fragmentation par impact électronique, bien adaptée à l'étude des molécules organiques, résulte de l'instabilité de l'ion moléculaire initialement formé. La molécule M dont la masse

est toujours paire (sauf s'il y a un nombre impair d'atomes d'azote), devient un radical-cation au nombre impair d'électrons, représenté par le symbole $M^{\cdot+}$. Lorsqu'un ou plusieurs hétéroatomes sont présents, l'ionisation se porte de préférence sur un des doublets libres (fig. 16.18). À ce stade la molécule M n'est pas encore fragmentée :



Le radical-cation va généralement se fragmenter. Or dans l'appareil ce n'est pas une seule molécule M qui a été introduite mais des milliards, si bien que le spectre montrera toutes les possibilités de coupures avec un facteur d'intensité qui traduira la probabilité de chacune d'elles.

Plusieurs facteurs favorisent les processus de fragmentation de $M^{\cdot+}$. On observe deux situations de base : ou bien il se forme un cation de masse impaire (et au nombre pair d'électrons), accompagné d'un fragment neutre à l'état de radical, ou bien un nouveau radical-cation fils apparaît, accompagné de la perte d'une molécule neutre.

- les fragments stables (ioniques ou neutres) ont plus tendance à se former.
- les fragmentations avec réarrangement sont favorisées lorsqu'ils correspondent à un état transitoire à six centres. On note souvent des transferts d'hydrogène sur le cation-radical.

Fragmentation d'une liaison σ ionisée

À partir d'un *hydrocarbure* tel le propane, l'ionisation d'une liaison σ C—C conduira plutôt à la formation du cation éthyle et d'un radical méthyle plutôt que l'inverse :



De même l'ionisation de l'isobutane conduit majoritairement à la perte d'un radical méthyle car le cation isopropyle est thermodynamiquement plus stable que le cation méthyle.

Fragmentation α

Avec une *cétone* (RCOR'), composé choisi en exemple, l'ionisation produit dans un premier temps l'arrachement d'un électron d'un des doublets libres de l'oxygène. Il y a ensuite, de façon prédominante, rupture par homolyse de la liaison σ (C—C) en position α du site d'ionisation. L'élimination de la plus grosse chaîne alkyle, sous forme de radical, est favorisée, mais on observera généralement les quatre ions fragments RCO^+ , $\text{R}'\text{CO}^+$, R^+ et R'^+ (fig. 16.29).

Pour les éthers ROR' , la rupture de la liaison C—C adjacente à l'oxygène conduit aux ions oxoniums stabilisés par résonance (fig. 16.30). On rencontre une situation analogue avec les amines (formation de l'ion iminium $\text{CH}_2 = \text{N}^+ \text{H}_2$ de masse 30, pour les amines primaires). En outre, par rupture de la liaison C—O, les éthers conduisent aux cations R^+ et R'^+ .

Toutes ces transformations font l'objet de règles semi-empiriques qui sont utilisées dans l'étude des composés inconnus et qui servent aussi, plus simplement, à contrôler les résultats auxquels conduisent les recherches automatisées avec les spectrothèques.

réarrangement de McLafferty

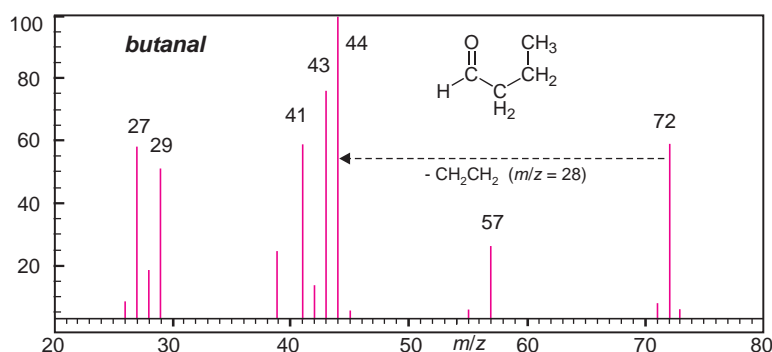
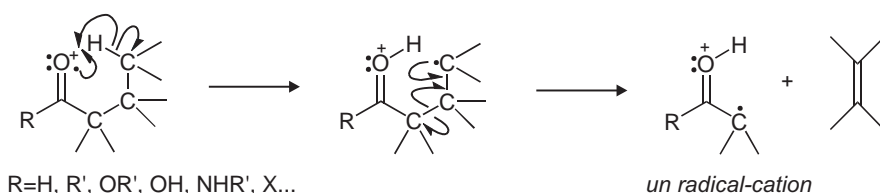
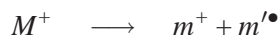


Figure 16.31 Réarrangement de McLafferty, dans le cas du butanal C₄H₈O.

Pics métastables

Pour aider à l'identification des ions, on peut exploiter leur caractère d'instabilité.

Un ion normal est suffisamment stable dans le temps pour lui permettre d'atteindre le détecteur. Si sa durée de vie est inférieure à quelques μ s, on a affaire à un *ion métastable* qui peut se décomposer entre source et détecteur (fig. 16.32).



Chaque ion individuel a une durée de vie aléatoire qui dépend de son énergie interne, mais un grand nombre d'ions identiques forme une population dont la décomposition obéit aux lois statistiques. On est en présence d'une transformation décrite par une cinétique du premier ordre. Ainsi, avec un appareil à double focalisation, si l'ion fils m^+ apparaît avant la sortie du secteur électrostatique, il se perd sur les parois de l'appareil, son énergie cinétique étant insuffisante. Par contre, si la décomposition se produit entre la sortie du secteur électrostatique et l'entrée du secteur magnétique, on peut observer, grâce à un réglage particulier de l'appareil, la trace de l'ion m^+ à une pseudomasse m^* qui ne correspond pas à sa masse réelle. La formule 16.28 relie les 3 positions sur le spectre :

$$m^* = \frac{m^2}{M} \quad (16.28)$$

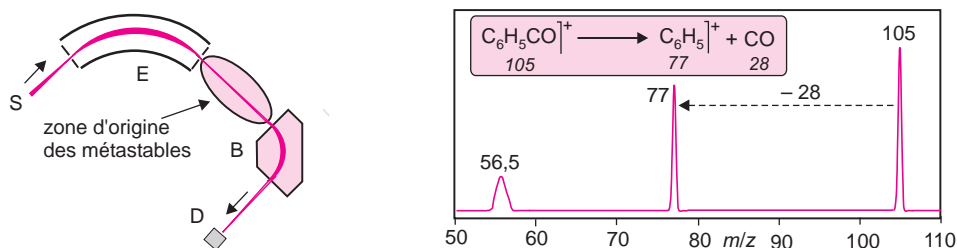


Figure 16.32 Pics métastables. Aspect théorique des trois pics constituant une transition métastable.

Une transition *métastable* conduit donc à trois pics sur le spectre dont le pic m^* , appelé *pic diffus* par suite de sa forme moins nette et de sa position qui ne correspond pas nécessairement à une masse proche d'une valeur entière (fig.16.33).

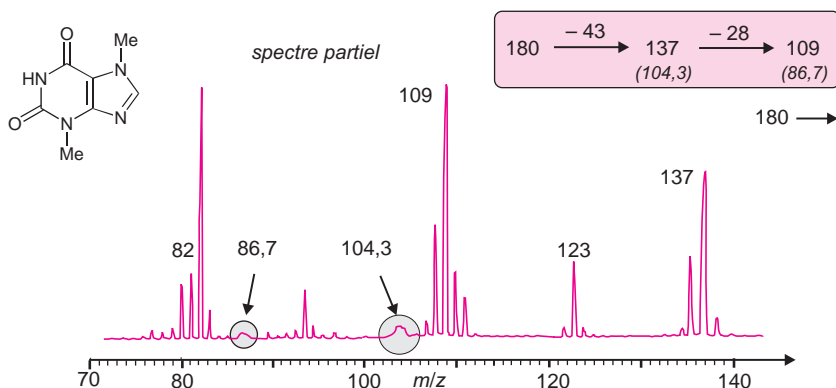


Figure 16.33 Apparition d'ions métastables au cours de la fragmentation de la théobromine.

L'ion moléculaire (180 Da), par perte de CONH^\bullet (43 Da) conduit à l'ion de masse 137 Da, transition métastable, accompagnée du pic diffus à 104,3. De même la perte de CO (28) à partir de l'ion 137, est un second exemple de transition métastable qui apparaît à $m/z = 86,7$ (reproduit avec l'autorisation de la Société Kratos).

Ainsi par le « *peak-matching* » et la recherche des métastables associés, il est possible de déterminer avec une grande certitude la structure des ions. Toutefois ce dernier procédé est devenu quelque peu vétuste, au regard des nouvelles techniques plus performantes (MIKE ou géométrie Nier-Johnson inversée), décrites dans des ouvrages spécialisés.

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.agilent.com
www.micromass.co.uk
www.waters.com

www.finnigan.com
www.shimadzu.com
www.gvinstruments.co.uk

www.bdal.com
www.varianinc.com

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 16.1

Le facteur isotopique δ (en ‰) de l'élément carbone, mesuré à partir du gaz carbonique de combustion d'une vanilline naturelle est de $\delta = -20$, alors qu'il est de $\delta = -30$ pour une vanilline de synthèse.

En se basant sur ces deux valeurs, trouver la composition centésimale en ces deux types de vanilline pour un échantillon de vanilline d'origine commerciale sachant que l'on a mesuré $\delta = -23,5$.

Exercice 16.2

Pour évaluer le volume d'une grande cuve de forme complexe, on utilise la méthode de dilution isotopique, avec, suivant l'habitude, un sel soluble de lutétium. Cet élément qui est constitué de deux isotopes stables, $^{175}\text{Lu} = 97,4\%$ et $^{176}\text{Lu} = 2,6\%$, a pour masse $M = 174,97 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

1) On procède comme suit : après avoir rempli la cuve avec de l'eau, on ajoute 2 g de trichlorure de lutétium hexahydraté $\text{LuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, dont la masse est de 389,42 g

Quelle est la masse de lutétium, X introduite dans la cuve ?

2) Après agitation pour bien mélanger le sel de lutétium, on prélève un échantillon de 1 L de l'eau de la cuve. On ajoute dans ce prélèvement 20 μg de trichlorure de lutétium hexahydraté préparé à partir de l'isotope ^{176}Lu pur ($^{176}\text{LuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} = 390,4 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$; $^{176}\text{Lu} = 175,94 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

a) Calculer la masse de ^{176}Lu , en μg , ajoutée à l'échantillon.

b) Par une méthode classique on trouve que le rapport des deux isotopes $^{175}\text{Lu}/^{176}\text{Lu}$ est égal à 9. Quel est l'appareillage le mieux adapté à la mesure du rapport isotopique ?

c) Trouver des arguments qui font que le lutétium correspond à un bon choix.

d) Calculer la masse x (également en μg) de lutétium élément, dans le litre d'eau prélevé.

e) Calculer enfin le volume de la cuve.

Exercice 16.3

Le vanadium est constitué de 2 isotopes dont les abondances sont $^{51}\text{V} = 99,75$ et $^{50}\text{V} = 0,25\%$.

Afin de doser cet élément dans un acier, on prélève 2 g de l'acier que l'on dissout en milieu acide. A la solution ainsi obtenue on ajoute 1 μg de ^{50}V .

Après mélange, on effectue l'analyse par la méthode ICP/SM qui permet d'obtenir sur le spectre de masse deux pics centrés sur les masses 50 et 51 de même surface.

a) Quel est le pourcentage de vanadium dans l'acier étudié en admettant que les rapports des aires des deux pics est le même que celui des masses de ces deux isotopes ?

b) Donner une solution plus rigoureuse sachant que :

$$^{50}\text{V} = 49,947 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1} \quad \text{et} \quad ^{51}\text{V} = 50,944 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}.$$

c) Expliquer pourquoi ce problème deviendrait plus compliqué si l'acier contenait du titane ou du chrome.

Exercice 16.4

La dibenzosubérone 1 est une cétone dont la formule développée est donnée ci-après.

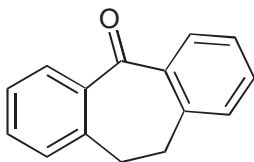
a) Calculer la masse précise du pic moléculaire le plus abondant et écrire les compositions isotopiques des différentes espèces constituant le pic $M + 1$.

b) Dans le spectre de masse de ce composé on remarque entre autres deux fragments de même masse nominale dont l'un résulte de la perte de CO et l'autre de C_2H_4 .

c) Expliquer uniquement la perte de CO à partir de l'ion parent, et indiquer si par perte de C_2H_4 on doit obtenir un ion positif, un radical ou un cation-radical.

d) Indiquer pour les deux fragments les formules brutes qui leur correspondent.

e) Sachant que le facteur de résolution du spectromètre de masse est de 15 000, est-il possible de distinguer les différentes espèces constituant le pic $M + 1$?



Exercice 16.5

Quel est le pourcentage de l'intensité du pic $M+1$ ($M = 721 \text{ u}$) par rapport au pic $M = 720 \text{ u}$ dans l'amas isotopique moléculaire du footballène (formule : C_{60}) ?

Donnée : l'élément carbone est formé de deux isotopes ^{12}C : 12u (98,9%) et ^{13}C : 13 u (1,1%).

Chapitre 17

Méthodes de dosage par marquage

*Plusieurs méthodes de dosage consistent à mélanger à l'échantillon une quantité connue du composé que l'on veut doser, sous forme marquée, afin qu'il soit reconnaissable. Quand après mélange des deux formes dans l'échantillon, on en récupère une petite partie, par un moyen adapté, il devient possible, à partir des proportions de chacune d'elles, de calculer la quantité initiale. Ce procédé est quasi-incontournable quand on fait des dosages de traces d'analytes après une étape d'extraction, rarement totale. On utilise principalement deux types de marquages, soit **isotopique** (stable ou radioactif) soit **enzymatique**. Ce dernier procédé est appliqué pour les tests de radio-immunologie (RIA, en voie d'abandon) et d'immunoenzymologie (EIA), dont font partie les tests ELISA. Réservés il y a peu de temps encore à l'étude de substances biologiques, leur application en chimie devient courante. Enfin une autre méthode d'analyse élémentaire, dite par **activation neutronique**, peut être rattachée aux précédentes. Elle implique l'irradiation de l'échantillon par des neutrons. Cette méthode d'une grande sensibilité rend radioactif, malheureusement, l'échantillon traité.*

17.1 PRINCIPE DES MÉTHODES DE MARQUAGE

Pour déterminer la concentration massique d'un composé dans un mélange, une méthode évidente mais utopique serait de le séparer en totalité pour pouvoir le peser. Malheureusement ce procédé ne peut que rarement être mis en application — l'extraction étant ni totalement sélective ni quantitative, voire impossible s'il s'agit d'une concentration très faible. On peut considérer néanmoins que la chromatographie analytique d'un échantillon, méthode séparative par excellence, est une manière indirecte de réaliser ce type d'approche. Il existe heureusement d'autres possibilités rassemblées sous le terme général de marquage. Pour doser un analyte dans un échantillon, on ajoute à la prise d'essai une quantité connue du même composé sous forme marquée, c'est à dire porteur d'une sorte d'*étiquette* qui a pour but de pouvoir le distinguer du composé réellement présent à l'origine dans l'échantillon. Ensuite, après avoir bien mélangé les deux formes, on en récupère une fraction pour calculer, d'après sa composition, la quantité initialement présente. Le marquage du composé ne doit pas altérer son comportement dans l'étape de récupération. Il ne s'agit pas d'une méthode classique d'ajout.

■ Les méthodes de marquage ne se rencontrent pas qu'en analyse chimique. Pour évaluer, par exemple, la quantité de saumons dans un bassin, on en pêche un certain nombre que l'on marque avec une étiquette avant de les relâcher. Au bout de quelques jours, on prélève un échantillon de poissons et à partir de la proportion de saumons marqués, on peut en déduire la population totale : si, après avoir étiqueté puis relâché 500 saumons on repêche 200 saumons parmi lesquels 10 sont marqués, le nombre total de saumons x sera tel que : $10/200 = 500/x$, soit $x = 10\,000$.

Plusieurs méthodes analytiques ont été développées à partir de ce principe. On peut marquer un élément ou une molécule :

- en modifiant le rapport isotopique de cet élément ou d'un des atomes de la molécule, soit avec un radioélément (détection par comptage en becquerels), soit avec un isotope stable (détection par spectrométrie de masse ou RMN). Ce sont les *analyses isotopiques*.
- en fixant une enzyme ou un dérivé fluorescent. Ce sont en particulier les analyses *immunoenzymatiques* et *immunochimiques*.

17.2 DILUTION ISOTOPIQUE AVEC UN MARQUEUR RADIOACTIF

Soit à doser un composé moléculaire X présent dans un échantillon. À une masse précise de cet échantillon, on ajoute une masse m_S^* du composé X marqué (ce marqueur est constitué par le même composé avec pour différence qu'un atome de la molécule a été substitué par un isotope radioactif). Appelons A_S l'activité spécifique de ce standard (activité en Bq par unité de masse) et A_X l'activité spécifique après dilution, calculée à partir d'un peu du mélange récupéré. Si $A_X < A_S$, c'est parce que la quantité de standard m_S^* de standard mise en œuvre se retrouve mélangée avec la quantité m_X de composé non marqué. En revanche l'activité globale est conservée, ce qu'on pourra traduire en écrivant :

$$A_S m_S^* = A_X (m_S^* + m_X) \quad (17.1)$$

équation qui permet de trouver la masse m_X de l'analyte dans l'échantillon :

$$m_X = m_S^* \left(\frac{A_S}{A_X} - 1 \right) \quad (17.2)$$

Si A_X est beaucoup plus petit que A_S on peut se contenter de la relation approchée :

$$m_X \cong m_S^* \frac{A_S}{A_X} \quad (17.3)$$

Ayant ainsi calculé m_X , il est facile, connaissant la masse d'échantillon utilisée, de remonter à la concentration de X dans l'échantillon.

Le traceur doit être uniformément mélangé dans l'échantillon et l'étape de ré-extraction doit porter sur des quantités suffisantes pour que l'erreur ne provienne pas des pesées. Un tel procédé n'est utilisable que pour doser des composés dont la concentration est suffisante pour que l'on puisse en récupérer une fraction. Si la concentration du composé à doser est faible, sa récupération à l'état pur, même partielle, peut devenir difficile. L'adaptation de la méthode aux très faibles quantités fait l'objet des paragraphes suivants.

■ La méthode précédente prend le nom de dilution isotopique inverse lorsque le composé à doser est déjà sous forme radioactive. Le principe est le même : on compare l'activité du produit à doser (mesurée sur une fraction isolée de celui-ci), avant et après dilution avec le composé non marqué. Les calculs sont identiques.

17.3 MÉTHODE SUBSTÆCHIOMÉTRIQUE

Les expressions 17.2 ou 17.3 montrent qu'il n'est pas nécessaire pour calculer m_X de connaître A_X et A_S , si on peut accéder directement à leur rapport. Cette observation est exploitée quand l'analyte est en très faible quantité, donc impossible à récupérer sous sa forme initiale par un procédé traditionnel.

La méthode consiste à faire un dérivé insoluble du composé à doser pour pouvoir en récupérer une partie. On reproduira de manière identique la réaction de dérivation sur le standard marqué seul (blanc analytique), puis sur l'échantillon, afin d'obtenir un même dérivé. Cette méthode, dite *substæchiométrique*, préfigure la méthode immunochimique pour le dosage de traces.

■ Soit à doser l'ion sulfate présent à l'état de quelques % dans une solution aqueuse. Après avoir additionné, en tant que marqueur, une quantité connue de $^{35}\text{SO}_4^{2-}$, on ajoute une solution d'un sel de baryum (formation de BaSO_4 insoluble) en quantité insuffisante par rapport à celle qu'il faudrait pour précipiter tout l'ion sulfate. En comparant l'activité du précipité recueilli avec celle du précipité obtenu à partir d'une même quantité de sulfate marqué seul, dans des conditions expérimentales identiques, on en déduira le rapport des activités, donc la quantité de sulfate (dilution isotopique inverse).

17.4 TESTS RADIO-IMMUNOLOGIQUES (RIA)

La méthodologie précédente, illustrée par le dosage de l'ion sulfate, a été transposée dès 1960 au dosage de l'insuline dans le sérum. La méthode qui a pris le nom de *radio-immunologie*, est une application de l'immunochimie *in vitro*.

L'idée de base est de séparer après mélange le composé faisant l'objet du dosage au moyen d'un réactif ultraspécifique (anticorps), rendant possible l'étude d'échantillons comportant des milliers d'autres substances. Cette approche a conduit aux immunodosages qui ont pris un essor fabuleux en bénéficiant du développement du génie génétique et de la biochimie.

Comme dans la méthode précédente, on mélange à l'échantillon contenant l'analyte, une quantité connue de ce même analyte sous forme marquée à l'aide d'un radio-isotope (fig. 17.1). Ensuite, pour isoler une fraction du mélange des deux formes, marquée et non marquée, on ajoute un anticorps spécifique de ce composé afin de capter un peu des deux formes. Elles seront dans le même rapport molaire qu'en solution. L'anticorps étant ajouté en quantité substæchiométrique, on séparera le mélange complexé par précipitation avant de procéder à son comptage.

La radio-immunologie — restée une méthode de choix pour certaines études de médecine clinique — a reçu peu d'applications pour le dosage des molécules de faible masses

moléculaires. L'utilisation de substances radioactives n'y est pas étrangère. En revanche, la méthode est couramment appliquée à des petites molécules marquées avec une enzyme (cf. § 17.7), notamment pour des applications dans le domaine de l'environnement.

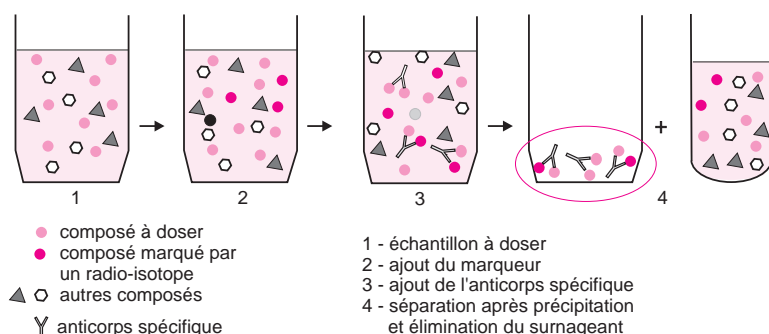


Figure 17.1 Test de radio-immunologie.
Les différentes étapes.

17.5 MESURE DES ACTIVITÉS RADIO-ISOTOPIQUES

Les méthodes précédentes imposent de faire des mesures de radioactivité, source de contaminations possibles. Elles nécessitent donc un environnement particulier, soumis à autorisation pour être en droit de manipuler les substances radioactives.

■ **Constante de radio-activité λ et activité A .** Tout radionucléide, quel que soit le type de rayonnement auquel il donne naissance, est caractérisé par sa période τ , temps au bout duquel la moitié des atomes constituant la population de départ (à l'instant initial $t = 0$) s'est décomposée. La loi de décroissance radioactive permet de calculer le nombre N d'atomes restant au temps t , pour une population comportant au départ N_0 atomes. La forme intégrée de cette loi s'écrit :

$$N = N_0 \cdot \exp [-\lambda t] \quad \text{avec :} \quad \tau = \ln 2 / \lambda \quad (17.4)$$

λ (unité : temps^{-1}) est la constante radioactive du radionucléide considéré. Or ce n'est pas N qui est connu, mais l'activité A ($A = dN / dt$), exprimée en becquerels Bq (1 Bq = 1 désintégration par seconde et 1 curie, Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Bq). L'activité, accessible par comptage au moyen d'un détecteur approprié, est en effet en relation directe avec la concentration du radionucléide :

$$A = \lambda \cdot N$$

17.5.1 Molécules marquées radioactives

Seuls les composés ou les éléments disponibles sous forme marquée sont susceptibles d'être dosés par cette méthode.

Des sociétés spécialisées fabriquent à façon des molécules organiques marquées sur un de leurs atomes (C, H, S ...). L'activité atteint environ 60 mCi/mmol, lorsque chaque molécule individuelle est porteuse d'un atome de ^{14}C en un site donné (fig. 17.2).

Dans la mesure du possible on préfère le ^{14}C au ^3H (tritium) facilement échangeable et dont l'autoradiolyse entraîne des difficultés de conservation des molécules tritiées.

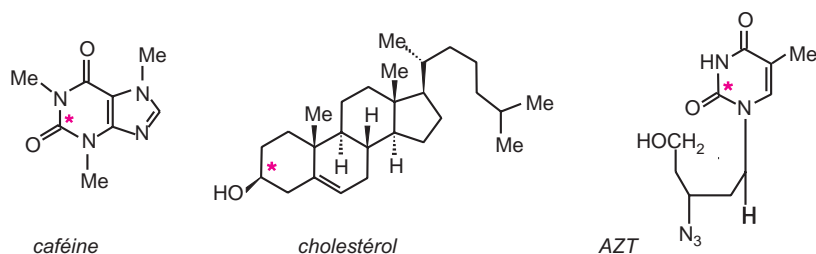


Figure 17.2 Trois molécules marquées en un seul site avec le ^{14}C

Ce radio-isotope a une période suffisamment longue qui permet un stockage aisé et évite de prendre en compte la diminution d'activité au cours du dosage par décroissance naturelle.

Tableau 17.1 Caractéristiques des principaux radio-isotopes.

Isotope	Période	Type	Energie (MeV)
^3H	12,26 ans	β^-	0,02
^{14}C	5730 ans	β^-	0,156
^{32}P	14,3 jours	β^-	1,7
^{35}S	88 jours	β^-	0,167
^{125}I	60 jours	C.E.I.*	0,149

(*) capture électronique interne, cf. 13.3.2

■ Le ^{14}C utilisé pour préparer les composés marqués provient de l'irradiation, dans un réacteur nucléaire, de cibles solides contenant des atomes d'azote (nitrure d'aluminium ou de béryllium), par des neutrons de faible énergie dits neutrons thermiques, résultant de la fission contrôlée d'atomes de ^{235}U . Le radiocarbone formé est ensuite isolé de la cible après oxydation à l'état de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$, forme sous laquelle il est livré aux chimistes. À partir de $^{14}\text{CO}_2$, il est en effet possible d'utiliser l'arsenal des réactions de la chimie organique pour synthétiser différents composés dans lesquels le radio-isotope peut être introduit en une position spécifique.

17.5.2 Instruments de comptage par scintillation

L'énergie du rayonnement des radio-isotopes choisis étant souvent insuffisante pour traverser la fenêtre d'un compteur Geiger-Müller, la technique de comptage consiste à mettre en solution le composé avec un scintillateur, baptisé *fluor*, qui transforme le rayonnement β en une luminescence proportionnelle au nombre de particules β émises. L'échantillon est dissous dans un solvant (toluène, xylène ou dioxane — ce dernier pour les produits solubles dans l'eau) qui joue le rôle de relais pour transférer l'énergie au scintillateur. Le mélange de scintillation est constitué, par exemple, de PPO (2,5-diphényloxazole — émission dans l'UV) et de POPOP pour une émission dans le visible plus favorable au photomultiplicateur (fig. 17.3). Le rendement quantique dépend de l'énergie des particules.

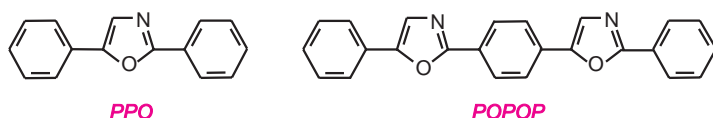


Figure 17.3 Deux exemples de scintillateurs courants : le PPO et le POPOP.

■ Un étalonnage du dispositif de comptage est nécessaire. Une partie de l'énergie dégagée par l'émission de la particule β^- est en effet absorbée sans être transformée en photons (piégeage chimique). En outre, une partie des radiations lumineuses peut être aussi réabsorbée par la solution si les spectres de fluorescence et d'absorption ont une partie commune (piégeage coloré, cf. chapitre 11).

Après avoir traversé un filtre pour délimiter une bande passante, les photons sont comptés pendant un temps donné, par un ou deux photomultiplicateurs travaillant en coïncidence (fig. 17.4). En CLHP, pour provoquer la fluorescence dans la cellule de mesure, on fait arriver conjointement la phase mobile éluée et le scintillateur liquide, ou bien on fait passer la phase éluée dans un capillaire dont la paroi est faite d'un verre scintillant.

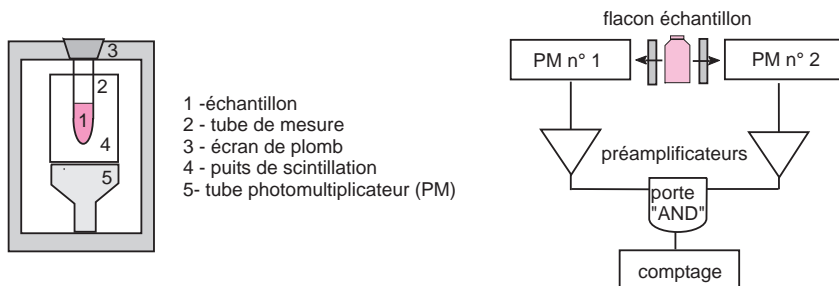


Figure 17.4 Système de comptage.

a) appareil comportant un puits de comptage et un photomultiplicateur pour mesurer la luminescence produite par l'échantillon mélangé à un cocktail de scintillation (en milieu aqueux ou non aqueux) ; b) appareil pour mesurer l'activité d'un radio-isotope de faible énergie par la méthode des coïncidences. Une seule particule β produit plusieurs centaines de photons. On peut donc en détecter un certain nombre au même instant avec deux PM en opposition. Le comptage n'a lieu que si les deux PM fournissent un signal dont le décalage n'excède pas quelques nanosecondes.

■ Les traceurs radioactifs posent des problèmes d'exposition et de traitement des déchets qui font courir des risques spécifiques à l'environnement et aux personnes qui les manipulent. Leur utilisation est donc soumise à des règles très strictes. L'obtention d'une licence pour détenir des composés radioactifs passe par un examen des locaux qui doivent répondre à certaines normes au niveau des rejets. Les précautions habituelles, tel que le travail avec des gants derrière un écran de protection, en utilisant des activités totales faibles et si possible des émetteurs de faible énergie, suffisent à éviter tout danger d'irradiation externe. Parmi les radio-isotopes les plus utilisés, seul le ^{35}S émet un rayonnement γ de forte énergie. Un écran transparent en plexiglas, dopé au plomb, de 1 cm d'épaisseur, suffit à se protéger des activités faibles (inférieures à 1 MBq). Mais il faut être attentif aux risques de contamination interne : un radio-isotope, même de faible énergie, est très dangereux lorsqu'il se fixe dans l'organisme. Il n'y a pas de relation simple et directe entre l'intensité d'irradiation (Bq) et la dose d'irradiation (Sievert), celle-ci étant fonction de la quantité d'énergie que cède le rayonnement par unité de masse à la substance irradiée.

17.6 ANTIGÈNES ET ANTICORPS

Les tests radio-immunologiques ainsi que les tests immunochimiques ELISA⁽¹⁾ qui sont décrits ci-après (§ 17.7) nécessitent. le rappel de quelques notions sur les anticorps, parce que la chimie et l'immunologie sont deux disciplines disjointes.

L'introduction, dans l'organisme, d'une substance étrangère (*antigène*) de masse moléculaire suffisante ($M > 5\,000$ Da), suscite la production de biomolécules appelées *anticorps*. Ce sont des glycoprotéines, appelées immunoglobulines (principalement des IgG).

Antigènes et anticorps s'agglutinent les uns aux autres. Les forces qui les lient sont dues aux liaisons hydrogène et aux liaisons hydrophobes. La cohésion est assurée également par la pression hydrostatique exercée par les molécules d'eau voisines.

L'antigène *induit* non seulement une réponse immunitaire, mais *réagit* avec l'anticorps qu'il a fait apparaître dans l'organisme vivant. Ces deux propriétés sont différentes. Ainsi les petites molécules organiques comme les pesticides ne sont pas capables d'induire la production d'anticorps. En revanche, elles réagissent si des anticorps adaptés sont déjà présents : ce sont des *haptènes*. Pour générer les anticorps propres à ces haptènes, il faut coupler ces derniers par liaison covalente à des protéines porteuses (BSA ou HSA « *Bovine* ou *Human Serum Albumine* »), ou à des polysaccharides. L'haptène doit donc avoir des groupements réactifs. Il est évident que cette modification de structure ne doit pas influencer sur la spécificité de l'anticorps produit.

■ **Anticorps polyclonaux.** La mise au point des anticorps est une phase difficile. Si une seule molécule d'haptène était liée à une protéine porteuse telle la protéine BSA de 66 000 Da, l'anticorps qui se formerait serait surtout dirigé vers les épitopes (désigne les parties de la protéine qui déclenche la production d'anticorps). On cherche donc à en fixer le plus possible (plusieurs dizaines). Ainsi, les anticorps obtenus deviennent majoritairement spécifiques de l'haptène. Pour cela, on injecte de manière sous-cutanée ou intradermique à 5 ou 6 souris, rats ou lapins, l'haptène greffé à la protéine porteuse accompagnée d'additifs. Cette primo-injection en plusieurs points correspond à environ 100 µg de pesticide. Les animaux, même s'ils ont un patrimoine génétique identique, ne réagissent pas de la même façon. Deux semaines après on recommence avec 5 fois moins d'immunogène et deux semaines plus tard on prélève du sang à ces animaux pour voir si l'anticorps est apparu. On répète 2 ou 3 fois encore ces injections, afin de créer une hyperimmunisation. Le sérum de ces animaux est alors devenu une source de l'anticorps cherché, de type polyclonal.

17.7 LA MÉTHODE DE DOSAGE IMMUNOENZYMATIQUE (EIA)

Une autre forme de marquage ne faisant pas appel à un isotope radioactif consiste à utiliser une enzyme. Dans ce cas l'étiquette (l'enzyme) est énorme par rapport à la molécule à doser. Comme les concentrations sont très faibles, la récupération fait appel à un anticorps. C'est un dosage immuno-enzymatique, dont la méthodologie la plus connue est celle des tests de type ELISA.

(1) *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay.*

17.7.1 Conduite d'un test ELISA avec compétition

1. Dans la première étape (fig. 17.5) on introduit une solution de l'échantillon, ou une solution étalon du composé à doser, dans un tube (ou une cuvette de microplaque) à fond transparent dont la paroi de matière plastique a été sensibilisée, c'est-à-dire recouverte de l'anticorps adapté fixé à la surface par adsorption.
2. On ajoute ensuite un volume connu d'une solution de ce même composé, relié par liaison covalente à une enzyme (ce *conjugué enzymatique* est souvent la peroxydase du radis noir). Les deux formes du composé entrent en concurrence pendant la durée de l'incubation pour se fixer sur les anticorps que porte la paroi.
3. Après un certain temps d'incubation (ex. 30 min.), les tubes sont lavés à plusieurs reprises avec de l'eau. Seules les molécules fixées restent dans les tubes. La quantité de composé associé à l'enzyme, sera d'autant plus grande qu'il y avait peu de ce composé à l'état libre dans l'échantillon.
4. On ajoute maintenant le substrat S spécifique de l'enzyme ainsi qu'un chromogène C, destiné à réagir sur le produit de réaction (ex. tétraméthylbenzidine).
5. L'enzyme fixée va transformer un grand nombre de molécules S en espèces P, qui vont réagir avec C pour donner un colorant. Le facteur d'amplification de l'enzyme rend ce type de test très sensible. Moins il y a de composé à doser dans l'échantillon, plus il y a d'enzyme fixée et plus la coloration est forte.
6. Enfin on arrête la réaction au bout d'un temps assez court en ajoutant un acide fort qui détruit l'enzyme. Il reste à procéder à la lecture du test avec un colorimètre.

■ La peroxydase du radis noir (ou *Horseradish peroxidase*, $M = 44\,000$ Da) est stable et réactive. Elle possède 4 résidus lysine qui ne participent pas à son activité, et qui servent à son couplage. Comme son nom l'indique, un substrat S de cette enzyme est le peroxyde d'hydrogène qu'elle décompose en faisant apparaître de l'oxygène qui réagit sur le chromogène (TMB, tétraméthylbenzidine). En présence de luminol, il apparaît une chimifluorescence stable pendant plusieurs minutes à l'origine de dosages extrêmement sensibles.

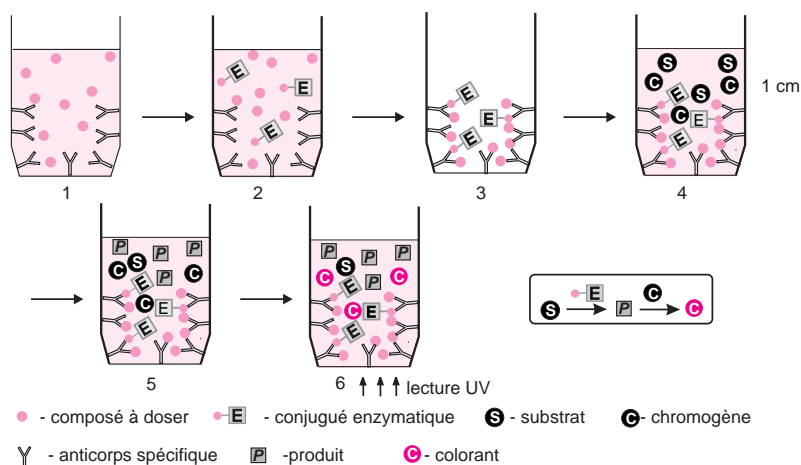


Figure 17.5 Les différentes étapes d'un test immunoenzymatique de type ELISA avec compétition (voir texte). En analyse clinique, il existe de nombreux dosages de ce type.

Cette méthodologie classique des biologistes est utilisée dans le domaine de l'environnement et de l'agroalimentaire (pesticides, anabolisants, aflatoxines, HPA). On ne peut cependant doser que les composés dont on dispose de l'anticorps adapté et du conjugué enzymatique.

17.7.2 La relation absorbance/concentration

Appelons N le nombre total de sites d'encrage sur la paroi, n^* le nombre de molécules marquées fixées, C^* la concentration de l'espèce marquée dans la solution et C la concentration inconnue de l'espèce non marquée à doser.

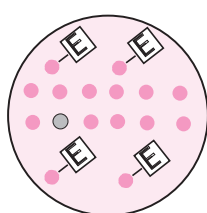
Le nombre de sites sur la paroi est très petit devant le nombre de molécules en solution. Les deux espèces marquée et non marquée vont donc se fixer sur les anticorps dans le rapport de leurs concentrations en solution (fig. 17.6).

$$\frac{n^*}{N - n^*} = \frac{C^*}{C} = R \quad (17.6)$$

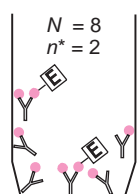
L'absorbance A étant proportionnelle à n^* , on aura $A = k \cdot n^*$, soit après calcul :

$$A = k \cdot N \cdot \frac{C^*}{C + C^*} = k \cdot N \cdot \frac{R}{1 + R} \quad (17.7)$$

En abscisse on porte les concentrations et en ordonnée l'absorbance relative (%) de la solution par rapport à la valeur obtenue avec un blanc (tous les sites de l'anticorps sont, dans ce cas, occupés par le conjugué enzymatique). On remarque que l'absorbance ne varie pas linéairement avec la concentration, mais si on choisit une échelle logarithmique pour les concentrations, on obtient, en première approximation, une partie rectiligne.



mélange en solution



mélange fixé
sur la paroi du puits

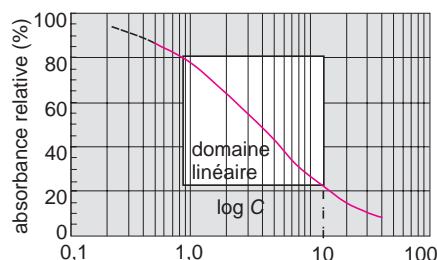
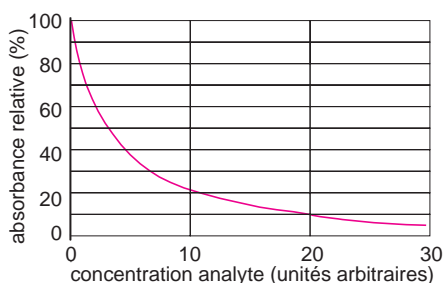


Figure 17.6 Relation concentration/absorbance des tests ELISA du type décrit.

Le rapport des deux espèces en solution ou fixées sur la paroi est le même (ici, il vaut 3). La linéarité en échelle semi-logarithmique n'est atteinte que dans un domaine étroit de concentrations.

■ La mesure finale d'absorbance peut être remplacée par une mesure de fluorescence (on réalise un ELISA fluorescent). Dans ce cas le conjugué enzymatique choisi est une phosphatase alcaline qui convertit le substrat spécifique en un produit fluorescent.

17.8 AUTRES TECHNIQUES IMMUNOENZYMATIQUES

La technique précédente ELISA avec compétition en milieu hétérogène existe sous plusieurs variantes. L'une d'elles, mise au point par la société Ohmicron, consiste à fixer de manière covalente les anticorps, non plus sur la paroi mais sur des particules magnétiques d'environ 1 μm (fig. 17.7). Cette méthode a pour avantages que :

- la quantité d'anticorps à mettre en jeu n'est pas limitée comme c'est le cas pour la paroi du tube ;
- la réaction anticorps/antigène est favorisée car les deux partenaires se mélangent mieux. Le milieu est à mi-chemin entre une phase homogène et une phase hétérogène.

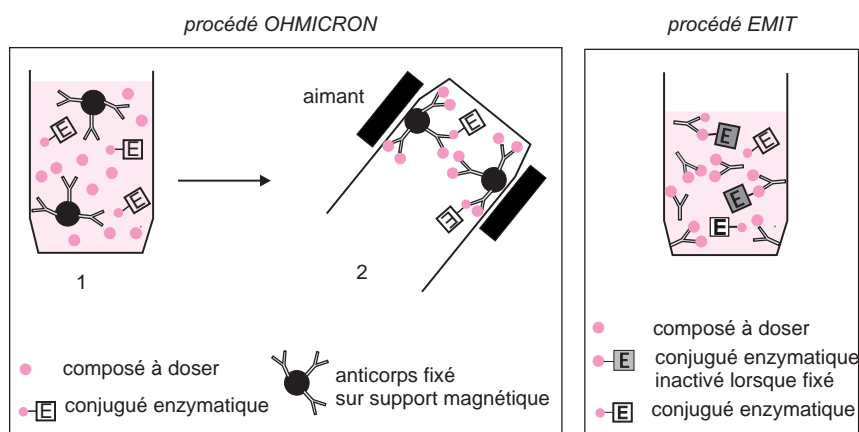


Figure 17.7 Les procédés OHMICRON et EMIT, variantes de l'ELISA de base.

Le test se déroule comme précédemment à la différence près que l'anticorps étant fixé aux particules magnétiques, on applique après incubation et avant lavage un champ magnétique pour coller les anticorps à la paroi.

Une autre méthode en phase homogène, reconnue pour doser des médicaments et des hormones est désignée par EMIT (*Enzyme Multiplied Immunoassay Test*, de Syva-Biomérieux).

Dans le tube contenant l'anticorps libre (non fixé), on ajoute l'échantillon et une quantité connue de l'antigène avec son enzyme (le conjugué enzymatique). Il se produit la compétition habituelle, excepté que l'antigène conjugué, fixé par l'anticorps, perd ses propriétés enzymatiques. Ainsi on évite l'étape de lavage et on ajoute directement le substrat. La coloration est due cette fois à la fraction de l'enzyme non fixée. Moins il y aura de composé, plus une part importante de l'enzyme sera dénaturée au contact de la paroi, et moins la coloration sera forte.

17.9 AVANTAGES ET DÉFAUTS DES TESTS ELISA EN CHIMIE

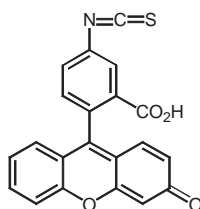
Les diverses techniques ELISA donnent des résultats précis et fiables. Les résultats sont obtenus plus rapidement que par chromatographie. Ils sont surtout destinés à éliminer tous les échantillons négatifs qu'il n'est donc pas utile de soumettre aux étapes d'extraction puis d'analyse chromatographique. Ils ont cependant quelques inconvénients :

1. La reconnaissance éventuelle de plusieurs molécules avec des sensibilités différentes est une source de dispersion des résultats. Il existe donc un risque de réaction croisée (un faux positif).
2. La gamme de mesure est étroite. Dès que la concentration augmente, on se trouve dans une zone de moindre précision (effet de l'échelle logarithmique pour les concentrations). On doit donc trouver la bonne dilution de l'échantillon.
3. Les microplaques doivent comporter des puits contenant tous la même quantité d'anticorps, avec la même réactivité, ce qui est techniquement difficile. L'immunisation d'un animal de laboratoire est un événement singulier, ce qui explique que les résultats puissent différer d'un kit à un autre.
4. La conservation des kits doit se faire au froid. Elle est limitée dans le temps, surtout pour les analyses sur le terrain.
5. On doit tenir compte dans le prix de revient de ces tests, des essais en double, des standards. Ces analyses ne deviennent rentables que pour un nombre important de dosages.

17.10 FLUORO-IMMUNOLOGIE (IFA)

L'emploi d'un anticorps marqué avec un dérivé fluorescent dérivé de la fluorescéine, de la rhodamine ou d'une luminarine, est utilisé pour nombre d'immunoglobulines humaines et animales. En revanche, la transposition de ce principe au domaine des tests immuno-chimiques de composés organiques simples est encore quasi inexistante. On peut craindre qu'il se produise une discrimination entre les espèces marquées et non marquées, lorsqu'on récupère par un procédé physicochimique une petite molécule organique ainsi étiquetée. Il existe donc peu d'exemples de dosages comportant une récupération suivie d'un examen de la fluorescence.

- Sous le terme d'immunofluorescence sont regroupées plusieurs techniques de diagnostic qui ne correspondent pas à des dosages mais à la mise en évidence, à l'examen au microscope sous éclairage en lumière ultraviolette, de certaines parties de la préparation obtenue par réaction avec un dérivé fluorescent tel l'isocyanate de fluorescéine très utilisé en biochimie.



17.11 MARQUAGE AVEC UN ISOTOPE STABLE

Le champ d'application de la méthode de dilution isotopique s'étend aux dosages utilisant des marqueurs non radioactifs en faisant appel à la détection par spectrométrie de masse ou par RMN, pour déterminer les variations des concentrations isotopiques. Elle est utilisée aussi bien pour les espèces moléculaires que pour la plupart des dosages d'éléments (une soixantaine ont des isotopes stables). Elle permet d'atteindre les ultratracés car, à la différence du marquage radioactif, pour lequel le dosage est basé sur la détection des *seuls* atomes qui se sont décomposés pendant le temps de la mesure, ici ce sont *tous* les atomes marqués qui sont pris en compte. Les *spectromètres de masse isotopiques* sont adaptés à ces mesures.

■ Soit à doser des traces de caféine dans un échantillon par la méthode couplée CLHP /SM. On commence par faire une solution de cet échantillon dans laquelle on ajoute une quantité connue de caféine marquée-d³(²) Par analyse CLHP, ces 2 caféines ont même temps de rétention. Au cours de leur co-élution, le détecteur mesure en alternance les intensités des pics $m/z = 194$ et $m/z = 197$. On obtient deux pseudochromatogrammes (fig. 17.8), l'un du pic 194 et l'autre du pic 197, dont les aires, moyennant étalonnage, permettent de déterminer la concentration de la caféine.

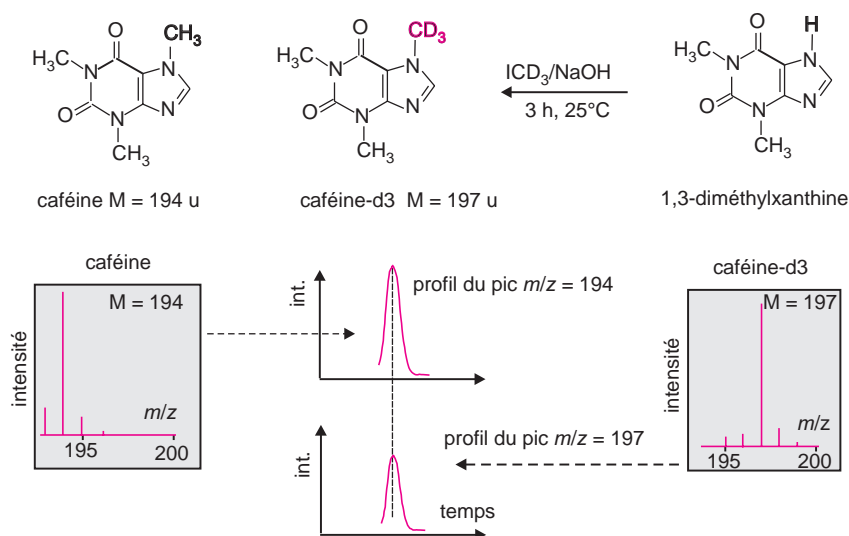


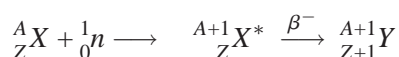
Figure 17.8 Dosage par CLHP /SM de la caféine par dilution isotopique.

L'isotope stable utilisé comme traceur est le deutérium D. La caféine - d³ est issue de la méthylation de la 1,3-diméthylxanthine par ICD₃.

(2) Par synthèse il est possible de remplacer, dans la caféine ($m = 194$ u), les 3H du groupement N - CH₃ du cycle à 5 chaînons par 3 atomes de deutérium (D). On dispose ainsi de caféine marquée de masse 197 u.

17.12 ANALYSE PAR ACTIVATION NEUTRONIQUE (NAA)

Une soixantaine d'éléments peuvent être identifiés et dosés après avoir été transformés en radio-isotopes de ces mêmes éléments par irradiation au moyen de particules. Cette méthode de marquage, dont la sensibilité dépend de l'élément (de 1000ppm au ppb), fait partie du domaine de l'analyse nucléaire multiélémentaire. L'activation par des neutrons est la plus employée car la technique est comparativement plus facile d'accès que celles faisant appel aux particules chargées. La capture d'un ou plusieurs neutrons par un noyau cible conduit à des isotopes de masses supérieures de l'élément correspondant, dont certains sont instables et se décomposent généralement par radioactivité de type β^- (voir équation ci-dessous). La radioactivité totale, qui naît au sein d'un échantillon formé de plusieurs éléments — chacun constitué d'une famille isotopique — conduit évidemment à un spectre d'émission complexe.



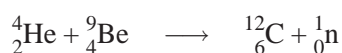
L'activité totale de l'échantillon diminue avec le temps, en suivant une courbe correspondant à l'enveloppe des activités superposées (à décroissance exponentielle) de chaque radionucléide présent. Cette activité globale ne permet pas, sauf cas exceptionnel, de retrouver la nature des éléments formés.

Le spectre β^- étant continu, on ne peut reconnaître la composition des éléments par le simple examen du rayonnement. On recherche plutôt l'émission γ , caractéristique de chaque nucléide, qui accompagne l'émission β^- . Ce rayonnement donne naissance à un spectre situé dans le même domaine que celui de la fluorescence X.

17.13 SOURCES DE NEUTRONS THERMIQUES

La probabilité de provoquer une transformation nucléaire dépend du nucléide et de l'énergie des neutrons, facteurs réunis dans un paramètre appelé *section efficace*. Parmi les procédés connus pour irradier un échantillon avec des neutrons, figure le recours aux flux intenses, de 10^{14} à 10^{18} neutrons $\cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, disponibles dans les réacteurs nucléaires d'au moins 100 kW. Pour un analyte dont la concentration est très faible, on atteint en quelques minutes des niveaux d'activation suffisants, même si l'isotope formé à une période longue. Le procédé impose quelques restrictions concernant l'échantillon à traiter. Celui-ci doit être thermiquement stable et de préférence sous forme solide. Il est enfermé dans un tube avec un témoin de concentration connue à usage d'étalon, avant d'être introduit dans le réacteur pourvu d'emplacements d'irradiation.

Pour éviter ces contraintes logistiques et coûteuses, de petites sources de neutrons constituées d'un émetteur α (quelques μg de ${}^{241}\text{Am}$ ou de ${}^{124}\text{Sb}$) encapsulé dans une enveloppe de béryllium ont été développées. L'équation nucléaire génératrice de neutrons, est la suivante :



Une variante est constituée par quelques μg de ${}^{252}\text{Cf}$ ($\tau = 2,6$ ans, source de neutrons rapides (2 MeV), ralentis par collision sur des atomes d'hydrogène ($2,4 \cdot 10^6$ neutrons $\cdot s^{-1} \cdot \mu g^{-1}$). Ces sources de faible intensité libèrent quelques millions de neutrons par seconde. Elles permettent de doser une vingtaine d'éléments.

17.14 ACTIVITÉ INDUITE — DURÉE D'IRRADIATION

Le nombre d'atomes radioactifs N^* qui s'accumulent dans l'échantillon au cours de l'irradiation tend vers une limite : à chaque instant, l'augmentation du nombre des noyaux N^* est égale à la différence entre la vitesse de formation, considérée comme constante (le nombre de noyaux cible N étant très grand) et celle de décomposition :

$$\frac{dN^*}{dt} = \varphi \cdot \sigma \cdot N - \lambda \cdot N^* \quad (17.8)$$

φ représente le flux de neutrons, λ la constante de décroissance radioactive, σ la section efficace de chaque atome cible dont le nombre est N . Ce nombre est lui-même relié à la masse m de la fraction isotopique f de l'élément considéré de masse atomique M . Si \mathcal{N} représente le nombre d'Avogadro, on a :

$$N = \frac{m}{M} \cdot \mathcal{N} \cdot f \quad (17.9)$$

Un calcul classique permet de transformer la formulation élémentaire 17.8 en forme intégrée, pour évaluer le nombre d'atomes N^* présents après le temps t :

$$N^* = \frac{\varphi \cdot \sigma \cdot N}{\lambda} (1 - \exp [-\lambda t]) \quad (17.10)$$

L'activité induite au temps t correspondant à $A = \lambda \cdot N^*$, on aboutit à l'expression :

$$A = \varphi \cdot \sigma \cdot N (1 - \exp [-\lambda t]) \quad (17.11)$$

Le terme entre parenthèses est appelé *facteur de saturation*. Il tend rapidement vers 1 lorsque t augmente. Ainsi, pour $t = 6\tau$, l'activité atteint 98 % de la valeur limite. Expérimentalement on ne dépasse jamais un temps de 4 ou 5 périodes du radioélément apparu. On préfère réserver cette méthode aux radioéléments de courtes périodes.

17.15 DÉTECTION PAR COMPTAGE — PRINCIPE DES MESURES

Le choix du procédé de détection dépend de la nature de l'émetteur et de la complexité du spectre émis. La solution la plus performante consiste à enregistrer le spectre γ qui accompagne la plupart des émissions β^- des radionucléides présents dans l'échantillon après activation (fig. 17.9).

À la différence du spectre β^- , continu en énergie, ce qui ne permet pas de reconnaître l'élément en cas de mélange, le spectre γ est quantifié, donc plus facile à identifier.

- Le capteur est soit un cristal de NaI(Tl) qui agit en transformant le photon γ en une luminescence dont l'intensité est proportionnelle à l'énergie du photon, du moins si le photon γ est entièrement absorbé par le cristal. Le fonctionnement est semblable à celui des scintillateurs liquides utilisés pour le ^{14}C , ou bien s'il s'agit d'un cristal de Ge(Li), il se comporte comme le gaz de remplissage d'un tube de Geiger-Müller.

17.16 APPLICATIONS

Si l'étalon et l'échantillon ont été irradiés ensemble, par conséquent dans les mêmes conditions, l'activité spécifique de l'élément X sera la même dans l'échantillon et dans l'étalon. L'activité totale étant proportionnelle à la masse de X , on écrira :

$$(Masse\ de\ X)_{\text{échantillon}} = (Masse\ de\ X)_{\text{étalon}} = \frac{(Act.\ totale)_{\text{échantillon}}}{(Act.\ totale)_{\text{étalon}}} \quad (17.12)$$

L'application de la relation précédente est valable si le rayonnement induit est simple, ou si on dispose d'un appareil de comptage muni d'un filtre permettant d'isoler le rayonnement dû au seul élément à doser. Mais souvent la matrice elle-même s'active et émet un rayonnement qui vient se superposer à celui que l'on veut évaluer. En introduisant un délai entre la fin de l'irradiation et l'étape de comptage, on élimine ainsi toutes les interférences dues à des émetteurs de courte durée de vie.

■ Supposons, par exemple, qu'on veuille doser des traces de fer dans un échantillon d'aluminium. Le ^{59}Fe ($\tau = 46$ jours) est caractérisé par une émission γ à 1,29 MeV, mais au cours de l'irradiation, l'aluminium donne naissance à du ^{24}Na , responsable d'une raie γ située à 1,37 MeV, par la réaction $^{27}\text{Al} (n, \alpha) ^{24}\text{Na}$ ($\tau = 15$ heures). Pour laisser à l'aluminium le temps de disparaître, on diffère la mesure de quelques jours.

Quand l'échantillon le permet, on peut également séparer le radioélément à doser par la technique de l'*entraînement*, avec un isotope stable de cet élément. Le même traitement effectué sur l'étalon, conduit à évaluer le rendement de l'extraction. On normalise ensuite le résultat à 100 %.

L'activation neutronique est une méthode d'analyse peu courante (fig. 17.9). Parmi les exemples d'applications, on peut citer la caractérisation des matériaux (métaux de haute pureté, semi-conducteurs...), l'étude de la répartition des éléments chimiques des matériaux fossiles, l'analyse d'ultratraces en archéologie ou les études géologiques et volcanologiques.

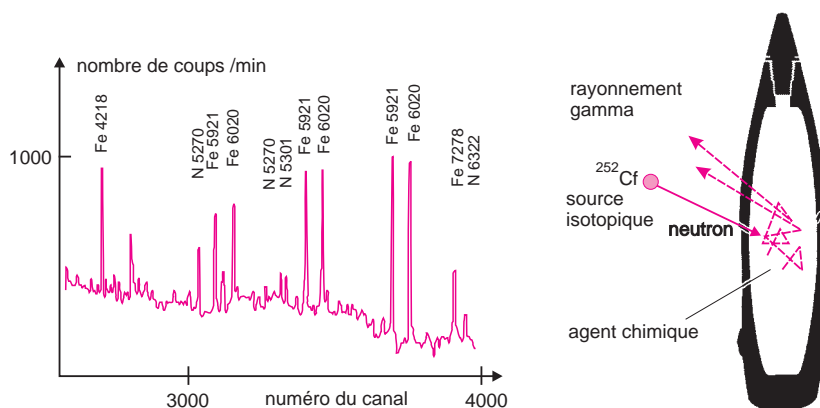


Figure 17.9 Une application non conventionnelle de l'activation neutronique. Lorsqu'il s'agit de détruire des obus d'arme chimique, il arrive qu'on utilise l'activation neutronique pour en connaître le contenu. Ce dessin, reproduit avec l'autorisation de la société EG & G Ortec, illustre le principe général de la méthode. En cartouche, une petite partie du spectre γ d'un obus contenant un agent chimique azoté, obtenu en quelques minutes.

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 17.1

Pour doser la pénicilline présente dans une préparation commerciale, on utilise une pénicilline de référence, marquée, dont l'activité spécifique est de 75 000 Bq.

On ajoute 10 mg de pénicilline marquée à 500 mg de l'échantillon. Après traitement on récupère 1,5 mg de pénicilline dont l'activité mesurée est de 10 Bq. Calculer la concentration (pourcentage massique) de pénicilline dans la préparation ainsi dosée.

Exercice 17.2

La patuline ($C_7H_6O_4$) est un composé dangereux pour la santé humaine qu'on peut trouver dans les jus de pommes ou de pamplemousses avariés. Actuellement la méthode courante de dosage fait appel à un test immuno-enzymatique de type ELISA. La solution étalon est constituée par une solution aqueuse, préparée juste avant emploi et contenant $1,54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de patuline pure.

Dans le test décrit, on utilise quatre tubes identiques dont la paroi interne est recouverte de l'anticorps adapté. Tous les tubes suivent le même traitement, seule diffère la solution introduite au cours de la première étape. On introduit :

- tube 1 (le blanc analytique) : 2 mL d'eau pure ;
- tube 2 : 1 mL d'eau pure et 1 mL de la solution étalon non diluée ;
- tube 3 : 1 mL d'eau pure et 1 mL de la solution étalon diluée à 50 % ;
- tube 4 (l'échantillon) : 2 mL du jus de fruit filtré après avoir été dilué 2 fois avec de l'eau.

On ajoute également dans chaque tube une même quantité de la solution de conjugué enzymatique ainsi que les autres réactifs nécessaires.

Après réaction les absorbances A des tubes sont les suivantes :

- tube 1 $A = 1,03$; – tube 2 $A = 0,47$;
- tube 3 $A = 0,58$; – tube 4 $A = 0,50$;

- a)** Calculer la concentration en ppm de la patuline dans la solution étalon.
- b)** Calculer les pourcentages d'absorbance (dénommés les % d'inhibition) des solutions des tubes 2, 3 et 4 par rapport au tube 1.
- c)** Expliquer pourquoi l'absorbance du tube 1 est plus grande que celles des autres tubes.
- d)** Calculer les concentrations de patuline dans les tubes 2 et 3 en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$.
- e)** Calculer la concentration en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ainsi qu'en ppb de la patuline dans ce jus de fruit.

Exercice 17.3

1. Pour doser l'élément chlore présent à une concentration très faible (de l'ordre de quelques ppm) dans un échantillon d'acier par la méthode d'analyse par activation neutronique (NAA), on dispose d'un réacteur produisant un flux de neutrons thermiques de $2 \times 10^{16} \text{ n/m}^2/\text{s}$.

a) Ecrire sous forme explicite, les réactions mises en jeu, ainsi symbolisées : $^{35}\text{Cl}(n, \gamma)^{36}\text{Cl}$ (émetteur β^- , $\tau = 3,1 \times 10^5$ ans) et $^{37}\text{Cl}(n, \gamma)^{38}\text{Cl}$ (émetteur β^- , $\tau = 37,3$ min).

b) Expliquer pourquoi on préfère se baser sur les raies d'émission γ de l'isotope ^{38}Cl plutôt que sur celles du ^{36}Cl .

c) Indiquer deux autres méthodes utilisables pour doser le chlore dans un acier. Préciser les avantages et inconvénients des méthodes choisies par rapport à la NAA.

2. Pour éliminer l'interférence due au manganèse (^{55}Mn) présent dans l'acier qui conduit au ^{56}Mn dont la période est de 2,58 heures et dont le rayonnement est intense, on sépare le chlore par précipitation sous forme de chlorure d'argent.

Procédé opératoire simplifié. On irradie par des neutrons, durant 5 min, dans le réacteur et dans des conditions identiques, d'une part une prise d'essai de l'échantillon d'acier à doser, et d'autre part un disque de papier filtre sur lequel on a préalablement déposé 100 μL d'une solution à 0,1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ d'ion chlorure (on a vérifié que le papier filtre ne contenait pas l'élément chlore). Après irradiation, l'échantillon d'acier est mis en solution par ébullition dans 40 mL de HNO_3 2M auquel on ajoute 2,00 g de KCl sec. La solution résultante est additionnée de 50 mL d'une solution aqueuse de AgNO_3 à 15 %.

Le précipité de AgCl est récupéré, lavé puis séché. Les résultats du comptage figurent ci-dessous :

prise d'essai	masse	masse AgCl	comptage γ (1,64 MeV) du ^{38}Cl
échantillon	0,51 g d'acier	3,726	11 203
standard	10 μg de Cl		48 600

a) Montrer que le nitrate d'argent est ajouté en quantité suffisante.

b) Calculer la concentration en élément chlore de l'échantillon d'acier.

Données : N = 14,007 ; O = 16 ; Cl = 35,453 ; K = 39,098 ; Ag = 107,868 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Exercice 17.4

On se propose de déterminer la concentration en insuline par la méthode de radioimmunologie (RIA) à l'aide d'une courbe d'étalonnage. Pour ce faire, on prépare des solutions étalons de la façon suivante : on ajoute à des solutions de concentration connue en insuline un volume constant d'une solution d'insuline marquée de telle façon que les concentrations finales en insuline soient respectivement égales à 3, 5, 7 et 9 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$. L'activité totale de chaque solution est mesurée égale à 20 000 coups /min. Une même quantité d'anticorps est ajoutée à chaque solution. Un complexe insuline-anticorps se forme. Il est isolé puis son activité est comptée. Le même protocole expérimental est suivi sur un volume connu d'une solution de composition inconnue en insuline. On obtient les résultats suivants :

C en insuline	3,0	5,0	7,0	9,0	inconnue
Activité	13 245	11 111	9 852	9 091	10 100

a) Pour chaque solution, calculer l'activité de l'insuline non complexée (libre). En déduire le rapport insuline libre / insuline complexée (R/R^*).

b) Tracer le graphique R/R^* en fonction de la concentration pour les étalons. En déduire la concentration en insuline de l'inconnu étudié.

Chapitre 18

Analyseurs élémentaires

Certains éléments ou composés sont beaucoup plus souvent dosés que d'autres. Pour répondre à ces besoins particuliers, les spectromètres et chromatographes polyvalents ne sont pas toujours les appareils les mieux adaptés pour des raisons de facilité d'emploi ou de rapidité d'analyse ou encore de coût. Ainsi, à côté de l'instrumentation classique, même « customisée » par des modifications logicielles ou matérielles, toute une panoplie d'appareils spécifiques reposent sur des propriétés particulières aux éléments ou espèces concernées, quelque fois uniques. Les cibles sont variées : éléments, ions, molécules (soufre, carbone, oxygène, cyanures, ozone, oxydes d'azote, benzène, HPA...).

On trouve cette analyse spécifique instrumentale dans des domaines aussi divers que les industries pétrolières, métallurgiques, agroalimentaires ou les secteurs de la pollution atmosphérique, des sols et des eaux, de la détection des armes chimiques, de la lutte anti-terroriste et bien d'autres secteurs encore. L'instrumentation des analyseurs spécifiques est donc loin d'être négligeable.

Ce chapitre passe en revue quelques méthodes originales en se limitant aux seuls éléments.

18.1 ANALYSES PARTICULIÈRES

Quand il faut assurer des centaines d'analyses par jour, les instruments et méthodes traditionnelles de laboratoire peuvent devenir inapplicables (ex. débit trop faible ou trop grande quantité de données à traiter). Un autre domaine, dont les besoins vont croissants est celui des systèmes d'analyse en continu, travaillant hors laboratoire, pour automatiser ou contrôler en temps réel de nombreux procédés de fabrication. Il existe donc d'autres instruments que les appareils généraux, qui correspondent à des systèmes intégrés pour obtenir des informations sur la concentration des constituants. La partie détection de ces instruments a beaucoup évolué avec la technologie des capteurs qui s'est imposée par sa diversité et qui ont rendu leur emploi plus facile pour un non-spécialiste.

Parmi les espèces qui font l'objet du plus grand nombre de demandes, figurent des atomes et des molécules. Quelques méthodes mises au point pour le dosage des éléments légers, le soufre le mercure sont décrites ci-après.

18.2 ANALYSE ÉLÉMENTAIRE ORGANIQUE

Le très grand nombre de composés moléculaires comportant à la fois l'élément carbone (C) et quelques autres éléments légers tels l'hydrogène (H), l'azote (N) et l'oxygène (O), est à l'origine d'une demande spécifique et importante de dosage de ces éléments. Les différents secteurs industriels (pétrochimie, pharmacie, agrochimie) ainsi que la recherche fondamentale qui gravitent autour de la chimie organique sont concernés.

■ Quand on synthétise des molécules au moyen de réactions, ou bien qu'on isole de nouveaux composés par extraction de sources d'origine naturelle on doit s'assurer de la structure et de la pureté de ces composés. Pour cela on doit effectuer leur analyse pondérale. Il s'agit dans ce cas d'un type particulier d'analyse (microanalyse élémentaire organique) qui consiste à trouver la composition élémentaire centésimale de la molécule étudiée, prise à l'état pur. Le dosage d'un seul élément voire de deux (C et H le plus souvent) permet de vérifier le bien fondé de la formule brute proposée pour une molécule non encore décrite dont la structure a pu être déduite de son étude spectrale. Par ailleurs, en comparant les % théoriques de chaque élément à ceux trouvés à partir d'un échantillon d'un composé dont on connaît la formule brute, on détermine sa pureté (fig. 18.1).

$C_{27}H_{27}N_3O_6S$	% calculé	C 62,18	H 5,22	N 8,06
$M = 521,5 \text{ g/mol}$	% trouvé	C 62,02	H 5,29	N 8,15

Figure 18.1 Exemple de présentation de résultats d'une analyse centésimale.

Pour ces éléments de faible masse atomique, les méthodes d'absorption atomique (inopérante par manque de sources adaptées) ou de fluorescence X (manque de sensibilité dû à un rayonnement de faible énergie) ne conviennent pas.

Le principe retenu pour doser ces éléments est de provoquer la combustion d'une prise d'essai de quelques milligrammes du composé en le portant à température élevée en présence de dioxygène. Pour ce faire on utilise des analyseurs dédiés aux seuls éléments indiqués précédemment. Les éléments généralement présents : H, C, N, O, sont récupérés sous forme de produits d'oxydation gazeux. Ceci a pour avantage de les séparer physiquement de la matrice.

■ L'analyse élémentaire organique fournit une information essentielle, mais insuffisante pour connaître la formule brute d'un composé totalement inconnu, cela pour plusieurs raisons. D'abord les appareils sont conçus pour ne doser qu'un petit nombre d'éléments parmi d'autres éventuellement présents. De plus, même si on a l'assurance que tous les éléments présents ont été dosés, la formule brute n'est connue qu'à un facteur entier près (dans l'exemple de la figure 18.1, la formule brute $C_{54}H_{54}N_6O_{12}S_2$ aurait la même composition centésimale en éléments). Pour lever cette ambiguïté on s'aide de la spectrométrie de masse ou de la RMN qui dans la plupart des cas, suffisent déjà par elles-mêmes à trouver la formule brute. Il faut remarquer enfin que pour tout composé, son analyse centésimale, bien qu'entachée d'une erreur expérimentale, alliée à la spectrométrie de masse par exemple, permet de trouver sa formule brute exacte, les atomes étant toujours en nombre entier.

18.2.1 Les méthodes historiques de Pregl et Simon

Les méthodes d'analyse élémentaire actuelles ont conservé le même principe de base depuis l'origine (1830). Il consiste à trouver la composition du composé organique à partir des gaz formés au cours de sa combustion. Dans un premier temps, on réalise la combustion rapide et à température élevée du composé en présence d'un excès de dioxygène. Il se forme, si les éléments C, H et N sont présents, du dioxyde de carbone, de l'eau et un mélange de diazote et d'oxydes d'azote. L'élément oxygène est déterminé dans un autre essai par combustion en présence de carbone pour former du monoxyde de carbone. Les différentes quantités de gaz formés conduisent par calcul aux % des éléments présents.

Dans les premiers appareils de microanalyse carbone/hydrogène mis au point par Pregl vers 1930, la combustion d'une masse précise d'environ 1 à 3 mg du composé était faite vers 750 °C dans un courant de dioxygène, la transformation de CO en CO₂ étant parachevée par passage sur un mélange d'oxyde de cuivre et de chromate de plomb (fig. 18.2). Les masses des éléments H et C étaient calculées à partir de l'augmentation de poids de deux tubes préalablement pesés, contenant l'un du perchlorate de magnésium (pour H₂O) et l'autre de la chaux sodée (pour CO₂). La précision atteignait 0,1 % si la balance appréciait le microgramme.

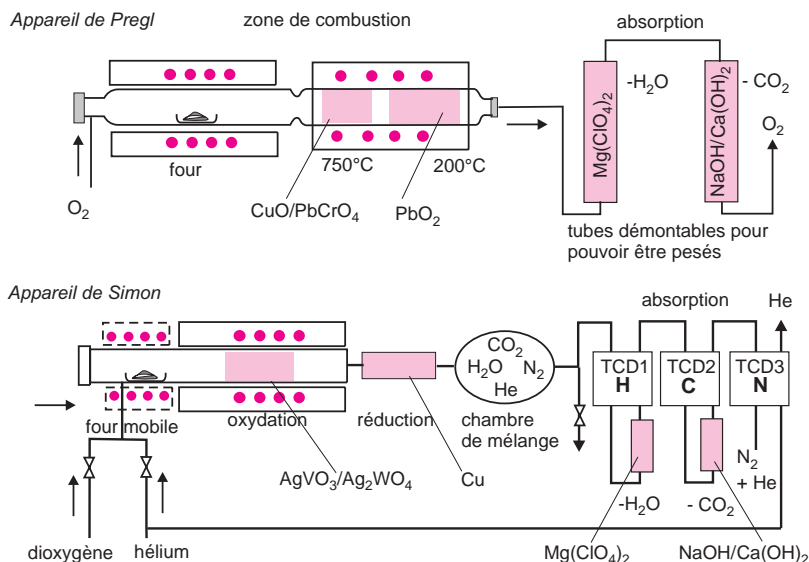


Figure 18.2 Les méthodes de microanalyse de Pregl et de Simon.

Des générations d'étudiants se souviennent avoir calculé, avec quelle appréhension, des formules brutes à partir des masses de CO₂ et d'eau piégés dans les absorbeurs démontables. Dans la version plus récente de Simon, les gaz de réaction passent sur de la poudre de cuivre pour réduire les oxydes d'azote en diazote. Trois détecteurs à conductibilité thermique (TCD) permettant d'avoir trois signaux témoignant de H₂O, CO₂ et N₂. Le dosage des trois éléments demande environ 10 minutes.

Plus tard (Simon, 1960) une seconde génération d'analyseurs a vu le jour (fig. 18.2), en ajoutant un dispositif de réduction des oxydes d'azote en diazote par de la poudre de cuivre. Ce sont les analyseurs CHN dans lesquels, pour simplifier les opérations, les doubles pesées

sont remplacées par des mesures de différences de conductibilité thermique des mélanges gazeux avant et après passage dans un piège sélectif pour l'eau ou le dioxyde de carbone.

Le fonctionnement est plus simple et robuste que celui des appareils à séparation chromatographique des gaz formés (cf. §18.2.2).

18.2.2 Analyseurs organiques élémentaires CHNS – O actuels

Les analyseurs modernes conservent le principe de la combustion de l'échantillon mais la séparation des gaz formés utilise une méthode chromatographique (fig. 18.3).

Une quantité de l'ordre du mg de substance est pyrolysée dans un courant de dioxygène et d'hélium. Les gaz de combustion passent ensuite sur de la poudre de cuivre pour retenir le dioxygène en excès (formation de CuO) et pour réduire les oxydes d'azote formés en diazote, du moins si cet élément est présent. Les éléments N, C, H et S sont donc à l'origine de quatre gaz N_2 , CO_2 , H_2O et SO_2 , séparables par une colonne de CPG de type remplie, associée à un détecteur à conductibilité thermique ou à capture d'électrons, plus sensible pour le SO_2 .

Certains modèles permettent de doser également l'élément oxygène, toujours dosé séparément, à partir d'un second échantillon, au prix d'une adaptation du four. La pyrolyse doit, en effet, être réalisée en l'absence de dioxygène en utilisant par exemple du carbone « nickelé » (le nickel possède un effet catalytique) pour obtenir du monoxyde de carbone CO.

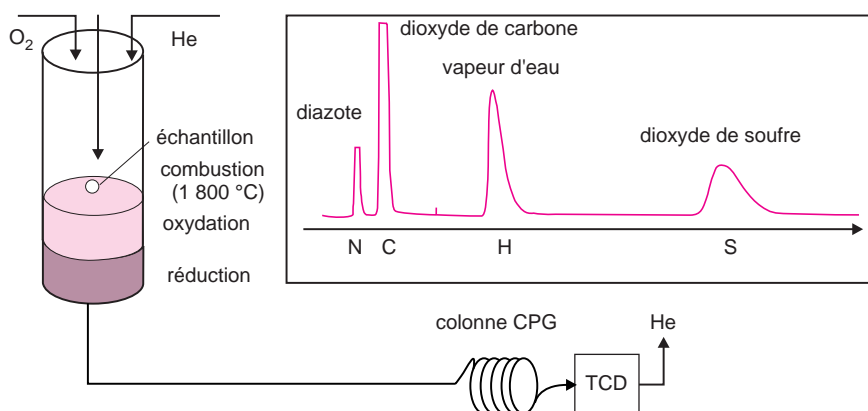


Figure 18.3 Appareil de microanalyse avec détection chromatographique.

La colonne remplie type Porapak sépare les 4 constituants gazeux entraînés par l'hélium utilisé comme gaz vecteur. Par un étalonnage préalable, on peut déduire de l'aire des pics la concentration de chacun de ces 4 éléments dans l'échantillon.

18.3 ANALYSEURS D'AZOTE TOTAL

La teneur en azote total sert à caractériser de nombreux produits et échantillons dans les industries du pétrole, du papier, du charbon. Pour effectuer ces dosages on préfère souvent aux instruments précédents des modèles adaptés à ce seul élément. Ainsi dans le secteur agroalimentaire la méthode de dosage de l'azote total selon Kjeldahl (TKN) est adoptée par

de nombreux pays comme référence pour le calcul des taux de protéines, dont on admet qu'il correspond à 6,5 fois le taux d'azote. Le TKN correspond à la somme de l'azote organique + NH_3 .

■ Dans la méthode de Kjeldahl, le composé azoté est tout d'abord « digéré » dans de l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur, avant d'être repris par de la chaux sodée (mélange d'hydroxyde de sodium, d'oxyde et d'hydroxyde de calcium) afin de transformer l'azote de la substance en une solution ammoniacale. On termine par un entraînement à la vapeur d'eau pour déplacer l'ammoniac formé (qui est volatil) et pouvoir le doser par acidimétrie. Cette méthode peut être rendue semi-automatique, mais elle souffre du handicap d'avoir recours à des réactifs corrosifs d'attaque et à des solutions titrées. Elle est de plus consommatrice de temps.

Les appareils actuels sont issus des analyseurs généraux CHN, basés sur la pyrolyse de l'échantillon afin de convertir l'élément azote soit en diazote, comme dans l'ancienne méthode de Dumas (1833), à la différence près qu'on ne mesure plus le volume gazeux avec une éprouvette graduée (fig. 18.5), soit en monoxyde d'azote pour une détection par chimifluorescence ou par ampérométrie.

L'échantillon (entre 100 et 500 mg suivant la teneur en azote), enfermé dans un petit récipient fabriqué en feuille d'étain, tombe dans un four vertical où il est minéralisé par combustion sous dioxygène. À ce stade, et au contact d'oxyde de cuivre, il se forme des oxydes d'azote. Ensuite ces oxydes, au contact de tungstène, sont réduits en diazote. Après passage sur un piège pour retenir l'eau et les gaz de combustion (fig. 18.4), ou bien par séparation sur une colonne de CPG, le diazote mélangé au gaz vecteur (CO_2 ou He) arrive sur un détecteur qui permet d'établir sa concentration. La détection est généralement basée sur la conductivité thermique du gaz (catharomètre).

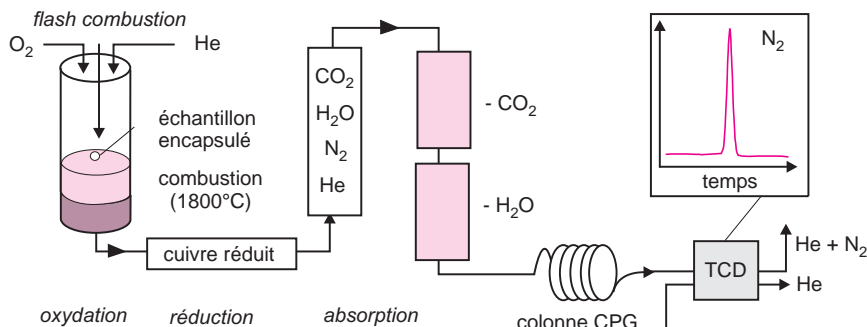
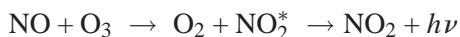


Figure 18.4 Appareil dédié aux analyses d'azote.

Cet appareil est une adaptation moderne de la méthode de Dumas révisée par le four vertical et la détection au moyen d'un catharomètre (gaz vecteur He).

■ Dans la méthode originale de Dumas (1840), la substance était chauffée à température élevée avec de l'oxyde cuivrique dans une atmosphère de dioxyde de carbone. L'élément azote se trouvait partiellement oxydé en oxydes NO_x qui étaient ensuite réduits sur du cuivre. Le pourcentage d'azote était calculé d'après le volume de diazote dégagé.

D'autres appareils sont basés sur la chimiluminescence des oxydes d'azote (cf. § 11.8).



Ou bien sur l'oxydation de NO au contact d'un capteur électrochimique (cf. § 20.7) :



Figure 18.5 Un analyseur d'azote.

Modèle NA2000 reproduit avec l'autorisation de la société Carlo Erba muni d'un passeur d'échantillons. Ce type d'appareil est utilisé pour le dosage des protéines.

18.4 ANALYSEURS DE SOUFRE TOTAL

L'élément soufre est souvent dosé en contrôle industriel par fluorescence X parce qu'il s'agit généralement de séries de prises d'essai qui sont comparées à des standards très ressemblants. Pour toute sorte d'autres échantillons qui peuvent être détruits par combustion dans un courant de dioxygène on se base sur la quantité de dioxyde de soufre (SO_2) formé dans un appareil semblable à ceux qui ont été précédemment décrits. Deux procédés de quantification co-existent pour lesquels les autres gaz de combustion n'interfèrent pas :

- Détection de la fluorescence dans l'UV du dioxyde de soufre, processus que l'on peut résumer comme suit, R-S désignant le composé :



- Action spécifique de l'iode sur SO_2 en présence d'eau, réaction exploitée par ailleurs pour le dosage de l'eau par la méthode de K. Fischer (chapitre 20). L'appareil détermine la quantité de courant pour générer à partir d'un électrolyte contenant un iodure, dans une cellule coulométrique, l'iode juste nécessaire pour oxyder SO_2 . Sachant qu'il faut 2 électrons pour oxyder une molécule de SO_2 , un atome de soufre correspond à $2 \times 1,6 \times 10^{-19} \text{ C}$.
- Réaction d'oxydation de l'anhydride sulfureux en acide nitrique au contact de l'électrode de travail d'une cellule ampérométrique (cf. § 20.9) :



18.5 ANALYSEURS DE CARBONE TOTAL

Le secteur du traitement des eaux domestiques ou industrielles fait appel à un type particulier d'analyseurs de carbone. Il est en effet utile de distinguer pour les échantillons de sédiments aqueux le carbone organique et inorganique si bien qu'on exprime trois valeurs correspondant respectivement au *carbone organique total* (COT), au *carbone inorganique total* (CIT) et enfin au *carbone total* (CT) qui représente la somme des deux autres.

Pour les très faibles concentrations de COT, une des méthodes consiste à exposer une cellule de mesure contenant l'eau à doser à des radiations UV (185 nm) afin de former des ions hydroxyles ($\text{HO}\cdot$) à partir du dioxygène dissous dans cette eau. Ces radicaux oxydent les composés organiques présents en dioxyde de carbone, ce qui modifie la conductivité de l'eau qui est mesurée entre deux électrodes de titane.

Le CIT est accessible par action d'un acide tel H_3PO_4 (le CIT étant essentiellement sous forme de carbonates) et le CT avec les analyseurs de carbone par oxydation catalytique de l'échantillon à température élevée (1 000 °C). Pour évaluer la quantité de dioxyde de carbone formé on fait soit une mesure de l'absorbance en infrarouge au moyen d'un appareil de type non dispersif (*cf.* § 10.7.2) soit une mesure coulométrique. Dans ce dernier cas, le CO_2 , entraîné par le gaz vecteur, balaie la cellule coulométrique contenant de l'éthanolamine et un indicateur colorimétrique sensible au pH. La variation de l'absorbance est liée à la quantité de CO_2 présente.

■ Pour les échantillons gazeux, on a également recours à des appareils comportant un détecteur à ionisation de flamme dont le signal est proportionnel à la concentration de COT.

18.6 ANALYSEURS DE MERCURE

Le mercure est un polluant dangereux par suite de sa faculté de donner des dérivés organiques extrêmement toxiques comme le diméthylmercure. Dans de nombreux sites concernant le traitement des eaux, les boues d'épandage ou les incinérateurs industriels on dose cet élément qui peut être présent aussi bien dans l'air que dans des phases condensées. Les méthodes doivent être très sensibles (ppb).

Suivant la nature de l'échantillon, on fait soit une pyrolyse de la prise d'essai en présence de catalyseur afin de faire apparaître le mercure sous forme métallique (vapeur $\text{Hg}(0)$), soit on commence par le décomposer à chaud avec un mélange oxydant constitué d'acides. Le mercure est alors transformé en ions $\text{Hg}(\text{II})$ que l'on réduit ensuite à l'état de mercure ($\text{Hg}(0)$) au contact d'un sel d'étain ($\text{Sn}(\text{II})$). La tension de vapeur du mercure est suffisante pour qu'un balayage de la solution par de l'air l'entraîne dans la cellule de mesure placée sur le trajet optique d'une lampe à décharge au mercure (fig. 18.6). La mesure est basée soit sur la raie d'absorption atomique de cet élément à 253,7 nm soit sur la fluorescence du mercure lorsqu'il est excité par ce même type de lampe (fig. 18.7).

Quand il s'agit d'une atmosphère à contrôler, on commence par concentrer le mercure sous forme d'amalgame en faisant passer le mélange gazeux dans un piège contenant de l'or. L'or amalgamé est ensuite chauffé pour désorber le mercure que l'on détecte et mesure comme précédemment.

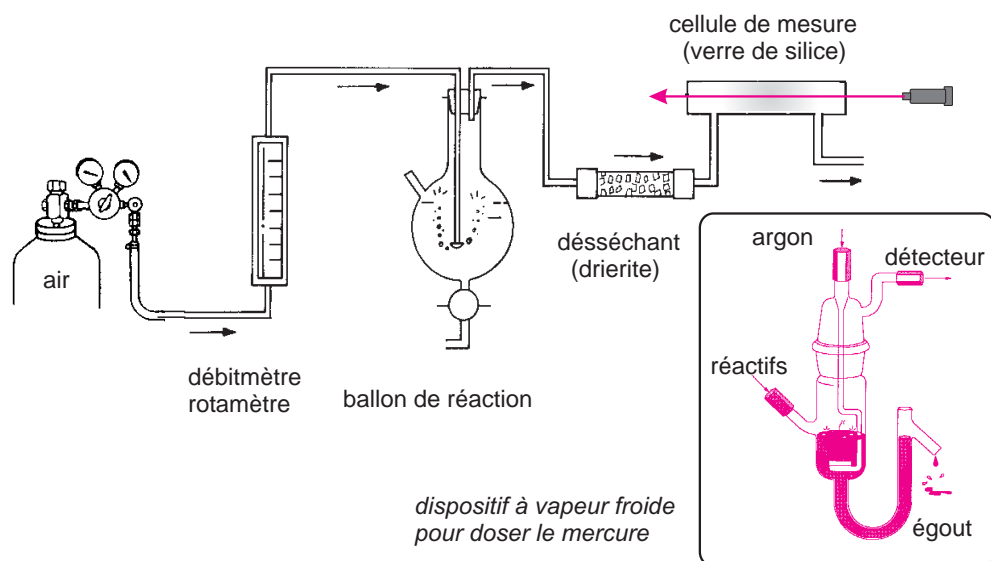


Figure 18.6 Un analyseur à mercure basé sur l'absorption atomique à vapeur froide. Modèle reproduit avec l'autorisation de la société Wilmad. En cartouche, modèle de réacteur avec de l'argon comme gaz vecteur pour entraîner les vapeurs de mercure (obtenues par réduction chimique au moyen de chlorure stanneux) vers la cellule de mesure.

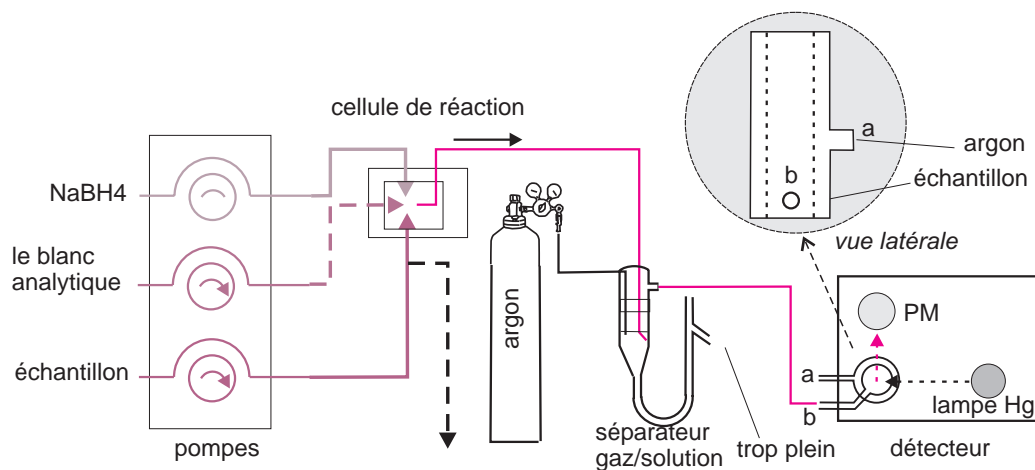


Figure 18.7 Un module de détection du mercure par fluorescence. Modèle reproduit avec l'autorisation de la société P. S. Analytical. La fluorescence est mesurée à 90° par rapport à la direction incidente. Le tube photomultiplicateur (PM) mesure la fluorescence.

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.leco.com

www.tekmar.com

www.ceinstruments.com

www.perkinelmer.com

www.antkhou.com

www.cosa-instrument.com

www.esainc.com

www.shimadzu.com

www.skalar.com

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 18.1

L'analyse d'un composé organique a montré qu'il ne contenait que du carbone, de l'hydrogène et de l'oxygène. Par combustion dans un appareil de Pregl, de 5,28 mg de ce composé, on obtient 10,56 mg de dioxyde de carbone et 4,32 mg d'eau.

Quelle est la formule brute du composé sachant que par spectrométrie de masse, on n'observe pas de pics d'intensité significative au dessus de $m/z = 89$?

On donne : $M(C) = 12 \text{ g/mol}$; $M(O) = 16 \text{ g/mol}$; $M(H) = 1 \text{ g/mol}$.

Exercice 18.2

Un analyseur basé sur l'absorption atomique et comportant un dispositif de réduction des éléments par le chlorure stanneux est employé pour doser le mercure dans une eau de rejet industrielle. On utilise le montage dit à *vapeur froide*. Trois solutions standards et la solution de l'échantillon à doser donnent les résultats suivants :

Solutions	conc. (ppb)	signal ($\mu\text{A} \cdot \text{s}$)*
Standard 1	0,02	16,66
Standard 2	0,05	42,52
Standard 3	0,2	171,2
échantillon	?	48,25

(*) intégration du signal d'absorbance en fonction du temps.

- Indiquer le principal avantage et le principal inconvénient de cette méthode.
- Calculer la concentration (ppb) en mercure de la solution échantillon.

Chapitre 19

Méthodes potentiométriques

L'électrochimie a donné naissance à plusieurs méthodes électroanalytiques qui permettent de faire des mesures quantitatives sur des échantillons variés. On distingue les techniques basées sur des mesures de potentiels (potentiométrie), et celles qui exploitent des mesures de courants (voltammétrie). Le premier groupe, traité dans ce chapitre, fait appel aux électrodes ioniques spécifiques (EIS). Le principe revient à créer une pile dans laquelle l'analyte intervient de façon que la différence de potentiel obtenue soit en relation avec sa concentration. La mesure des pH, probablement la plus courante des mesures électroanalytiques, en fait partie. La plupart des dosages concernent des ions en solution aqueuse, mais certaines électrodes à membranes sélectives permettent également de doser des molécules. La sensibilité de ces dosages est très grande. Si l'échantillon à doser est complexe, ce qui peut entraîner un manque de spécificité, on préfère à la potentiométrie directe, les dosages complexométriques ou titrimétriques. La potentiométrie est donc une méthode d'analyse aux applications multiples. Les instruments vont des pH-mètres peu coûteux aux titrimètres automatiques.

19.1 GÉNÉRALITÉS SUR LES CELLULES DE MESURE

Tout dosage potentiométrique repose sur une mesure de différence de potentiel dans des conditions de courant nul, entre deux électrodes qui plongent dans une solution de l'échantillon (fig. 19.1). Chaque électrode constitue une demi-pile. On distingue :

- L'électrode de référence extérieure (ERE), qui forme une demi-cellule électrochimique de référence, dont le potentiel est constant par rapport à celui de la solution échantillon.
- L'électrode ionique sélective (EIS), encore appelée électrode de travail qui comporte une électrode de référence interne (ERI) baignant dans une solution de l'analyte faisant l'objet du dosage et servant de référence. Cette électrode est séparée de la solution échantillon par une paroi appelée *membrane*, perméable si possible au seul analyte étudié.

La chaîne de mesure ainsi réalisée est donc la suivante :

Elec. sélective / membrane / sol. échantillon / Jonction liq. / Elec. référence ext.

Pour l'étude des solutions aqueuses, l'électrode de référence extérieure est très souvent une électrode Ag /AgCl (un fil d'argent recouvert de chlorure d'argent baignant dans une solution de chlorure de potassium). Le contact électrique avec la solution étudiée s'effectue par l'intermédiaire d'une fine pastille poreuse en verre fritté. Les ions ayant tendance à

migrer à travers elle, il en résulte un faible potentiel de jonction E_J que l'on diminue en choisissant comme pont salin une solution saturée de chlorure de potassium.

La différence de potentiel (ddp) entre l'électrode de référence interne et la paroi interne de la membrane de l'électrode sélective est une constante fixée par construction (nature de l'électrode de référence et solution de référence d'activité $a_{i,\text{référence}}$). En revanche, la ddp qui apparaît entre la paroi externe de la membrane et la solution échantillon ($E_{\text{memb.}}$) dépend de l'activité de l'analyte ($a_{i,\text{solution}}$), ce que traduit la relation suivante dérivée de l'équation Nernst :

$$E_{\text{memb.}} = 2,303 \frac{RT}{zF} \log \frac{a_{i,\text{solution}}}{a_{i,\text{référence}}}$$

La ddp mesurée E_{cellule} entre les deux bornes de la chaîne de mesure est donc :

$$E_{\text{cellule}} = E_{\text{ERI}} + E_{\text{memb.}} - E_{\text{ERE}} + E_J$$

Les deux termes E_{ERI} et E_{ERE} sont indépendants de la concentration en analyte i à doser. Au cours d'un dosage, ils n'ont pas de raisons de varier. Il en résulte que le potentiel de la cellule dépend de celui de la membrane (à l'approximation près de E_J).

Finalement la différence de potentiel mesurée est reliée à l'activité a_i de l'espèce ionique i à doser dans la solution échantillon par :

$$E_{\text{cellule}} = E' + 2,303 \frac{RT}{zF} \log a_{i,\text{solution}} \quad (19.1)$$

E' , potentiel standard de la chaîne de mesure utilisée, rend compte de tous les autres potentiels, R est la constante des gaz parfaits, F la constante de Faraday (96 485 C), T la température, z la charge de l'ion i analysé (y compris le signe + ou -) dont l'activité est a_i .

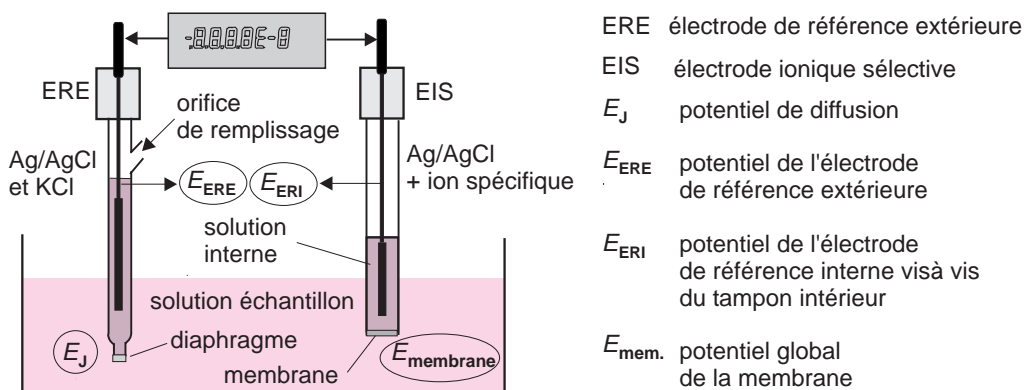


Figure 19.1 Chaîne électrochimique de mesure avec une électrode ionique sélective (EIS).

Suivant la concentration de l'ion spécifique dans la solution échantillon, le potentiel de la membrane, perméable à l'ion, varie. Les autres potentiels sont imposés par construction. La mesure est faite avec un ionomètre. L'une des demi-cellules joue le rôle de cathode et l'autre d'anode. Par souci de robustesse les constructeurs proposent aussi des électrodes combinées, en réunissant les deux électrodes (externe et sélective) dans un même ensemble ce qui forme l'essentiel d'un capteur.

■ L'activité a_i d'un ion i est reliée à sa concentration c_i par la relation $a_i = \gamma_i \cdot c_i$, dans laquelle γ_i est le coefficient d'activité, qui dépend de la force ionique totale I , c'est-à-dire de la quantité et de la charge de l'ensemble des ions présents dans le milieu ($I = 0,5 \sum c_i \cdot z_i^2$). Ainsi, pour l'ion i , de charge z , l'expression 19.1 devient :

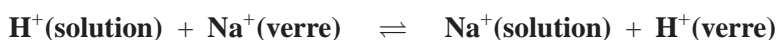
$$E_{\text{cellule}} = E' + 2,303 \frac{RT}{zF} \log \gamma_i c_i \quad (19.2)$$

Dans le cas de solutions diluées, la loi de Debye-Hückel $\log \gamma_i = -0,5 z_i^2 \sqrt{I}$ montre que, pour une valeur donnée de I , γ_i est constant. C'est pourquoi on ajoute aux solutions de la gamme étalon et aux solutions échantillons, une même quantité d'un électrolyte inerte, dit « électrolyte support » afin d'apporter un excès important d'ions indifférents, ce qui stabilise la force ionique à une même valeur. C'est l'**ISAB** (pour **I**onic **S**trength **A**djustment **B**uffer) qui rend donc négligeable les variations de γ_i . Dans ces conditions, la différence de potentiel mesurée ne dépend que de la concentration en ions à analyser et la relation 19.2 devient :

$$E_{\text{cellule}} = E'' + 2,303 \frac{RT}{zF} \log c_i \quad (19.3)$$

19.2 UNE ÉLECTRODE SÉLECTIVE PARTICULIÈRE : L'ÉLECTRODE PH

C'est une électrode spécifique aux ions H^+ , encore appelée *électrode de verre*. C'est la plus sélective. Le verre dont il est question ici, ne désigne pas le matériau du corps de l'électrode (qui peut aussi bien être en matière plastique), mais la membrane qui assure le contact avec la solution. Il s'agit d'une mince paroi d'un verre spécial à forte teneur en sodium (25 %), dont la surface s'hydrate en présence d'eau et devient comparable à un gel, alors que le reste correspond à un électrolyte solide. Ce verre se présente à l'échelle microscopique comme un réseau issu d'un orthosilicate (sel de l'acide orthosilicique $Si(OH)_4$) dont la structure lacunaire contient des cations sodium qui permettent le déplacement des charges d'une face à l'autre de la membrane (fig. 19.2). Celle-ci est en contact, à l'extérieur, avec la solution à analyser et, à l'intérieur, avec l'électrolyte dont l'acidité est constante. Les deux parois sont le siège d'échanges entre cations Na^+ et H^+ .



Si la concentration en H^+ est différente sur les deux parois, une *ddp de liaison* apparaîtra entre elles, dont la valeur va être indicatrice de l'activité en ion H^+ de la solution, donc de son pH. Celui-ci est déterminé avec un millivoltmètre électronique, le pH-mètre, en mesurant la ddp entre l'électrode de verre et une électrode extérieure de référence $Ag/AgCl$ (maintenant préférée à l'électrode au calomel (Hg), pour l'environnement). L'appareil, après avoir été étalonné, fournit directement le pH de la solution. On trouve souvent ces électrodes sous forme combinées de manière concentrique.

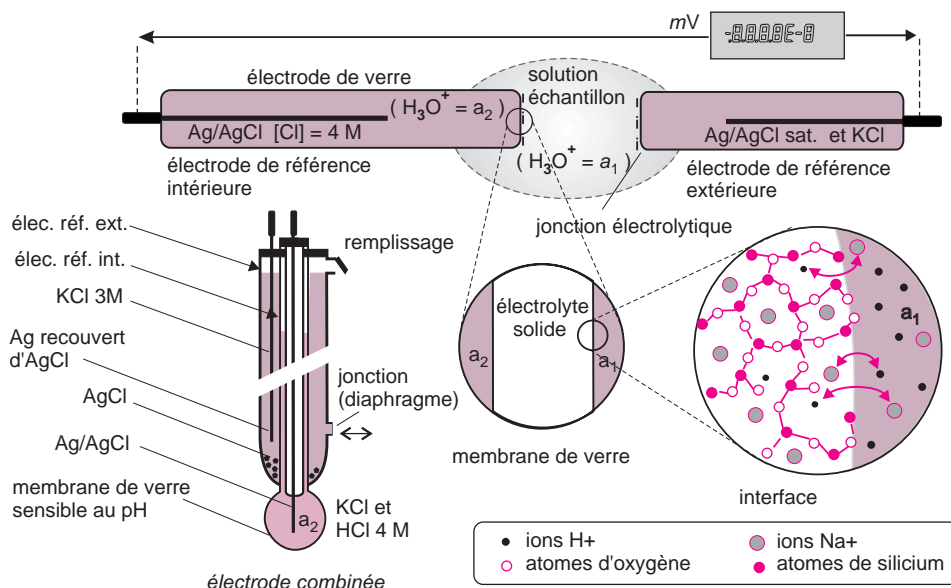


Figure 19.2 Electrode de verre pour la mesure du pH.

La concentration en ions H^+ est accessible à partir de la différence de potentiel qui apparaît entre une électrode de verre et une électrode de référence (ici une électrode Ag/AgCl). Détail de la membrane, vue en coupe, perméable aux ions H^+ . Quand un ion H^+ forme une liaison silanol, un ion sodium part en solution pour conserver l'électroneutralité de la membrane. Une électrode combinée de présentation classique, l'électrode de référence entourant l'électrode de verre, sauf à son extrémité. La jonction permet la migration des ions sans que les liquides de part et d'autre ne se mélangent.

19.3 LES PRINCIPAUX TYPES D'ÉLECTRODES IONIQUES SÉLECTIVES

Dès les premiers temps de la potentiométrie, on s'était aperçu que, suivant la composition du verre utilisé comme membrane, on pouvait avoir des interférences avec les autres ions alcalins présents, pour des valeurs du pH supérieures à 13 : c'est l'*erreur alcaline*. En mettant à profit ce défaut initial, il a été mis au point des verres répondant sélectivement à quelques ions monovalents tels Na^+ , K^+ , Li^+ et Ag^+ . La sélectivité dépend du matériau qui sert de membrane et qui sépare la solution à analyser de l'intérieur de l'électrode. Il s'agit dans tous les cas de disposer d'un matériau ionique permettant la formation d'équilibres de concentration avec un ion spécifique. Si l'activité (ou la concentration) de l'ion est différente entre les deux faces de la membrane, il apparaît une ddp. Seuls les ions libres sont pris en compte dans le dosage. Les demi-cellules de référence standard contiennent KCl comme électrolyte qui, normalement, suinte au travers d'un diaphragme pour assurer la jonction avec la solution de l'analyte. Pour éviter de perturber les mesures lorsqu'il s'agit du dosage de K^+ ou de Cl^- , on utilise un électrolyte gélifié ou un second électrolyte non interférant (fig. 19.3).

Il existe une vingtaine d'électrodes ioniques spécifiques (EIS) d'usage courant, classées selon la nature de la membrane. Elles servent soit en ionométrie directe, soit comme électrodes indicatrices pour de nombreux dosages titrimétriques et complexométriques avec l'aide de titrimètres automatiques.

19.3.1 Membrane minérale cristalline

L'exemple le plus connu est celui du trifluorure de lanthane dopé avec un sel d'euprium ce qui permet aux atomes de fluor de se déplacer dans le réseau cristallin. Ce matériau, à l'état de monocristal, est utilisé comme membrane pour l'électrode fluorure (fig. 19.3). L'ion OH^- peut créer une interférence avec les ions F^- pour les pH alcalins.

Les poudres cristallines agglomérées sous pression (dosages des ions Cl^- , Br^- , I^- , Pb^{++} , Ag^+ , et CN^-) sont d'autres exemples. L'électrolyte interne peut être éliminé (contact sec, sans électrolyte), mais il est préférable d'intercaler une couche d'un polymère ayant une conductivité de type mixte pour assurer le passage des électrons de la membrane à conductivité ionique vers l'électrode à conductivité électronique (fig. 19.3).

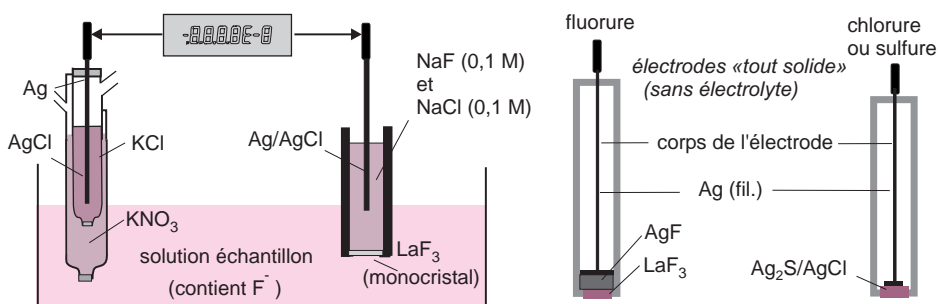


Figure 19.3 Électrodes ioniques spécifiques.

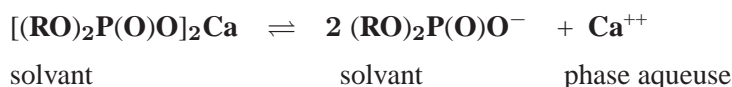
Cellule de mesure comportant une EIS de l'ion fluorure en solution avec une électrode de référence à jonction double. Des 2 côtés de la membrane naît 2 équilibres $\text{LaF}_3 \rightleftharpoons \text{LaF}_2^+ + \text{F}^-$. Pour éviter l'osmose du KCl dans la solution à doser, l'électrode de référence est entourée d'une seconde chambre qui contient un électrolyte auxiliaire non interférant. Ainsi KNO_3 1M, difficile à oxyder ou à réduire, est très utilisé pour F^- , Cl^- , I^- , CN^- , S^{--} ou Ag^+ . La mesure exige un millivoltmètre à haute impédance (type pH-mètre). A droite deux exemples d'électrodes « tout solide » : fluorure avec cristal LaF_3 et chlorure avec pastille frittée.

19.3.2 Membrane liquide

La séparation entre les solutions interne et externe de l'électrode spécifique est ici obtenue par un disque poreux hydrophobe (diamètre 3 mm), imbibé d'un solvant organique non miscible avec l'eau des solutions situées de part et d'autre, et contenant un *ionophore* (fig. 19.4).

De ce fait, on considère que la membrane est un *liquide immobilisé*. Le contre-ion est une molécule soluble dans la phase organique.

Pour l'ion calcium, par exemple, on peut utiliser un diester aliphatique de l'acide phosphonique $(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{O}^-$ (fig. 19.5). De chaque côté de la paroi on est en présence d'équivalents de concentration du type :



Si les concentrations des ions calcium sont différentes des deux côtés de la membrane, il apparaît une ddp mesurable.

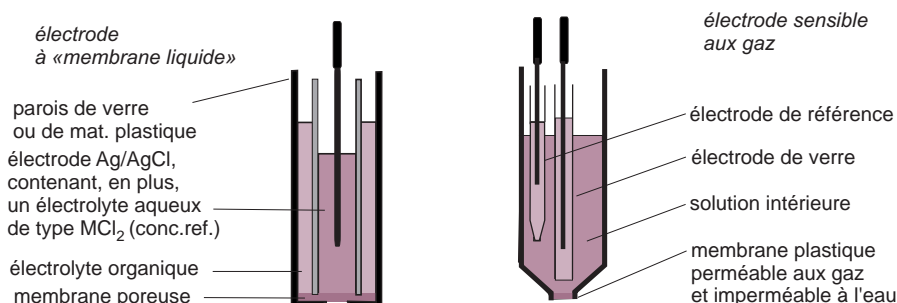


Figure 19.4 Électrode à membrane liquide et électrode à diffusion gazeuse. L'électrode à diffusion gazeuse est construite à partir d'une électrode de pH plongeant dans une solution intérieure.

19.3.3 Membranes polymériques

Beaucoup d'EIS commerciales comportent une membrane constituée par un film de polychlorure de vinyle (PVC) dans lequel est (ou sont) dispersé (s) un ou plusieurs transporteurs d'ions, ioniques ou neutres (fig. 19.5). Une quarantaine de molécules chélatantes sont utilisées pour une dizaine d'ions communs. Les électrodes pour ClO_4^- , BF_4^- , NH_4^+ , Ca^{++} sont de ce type.

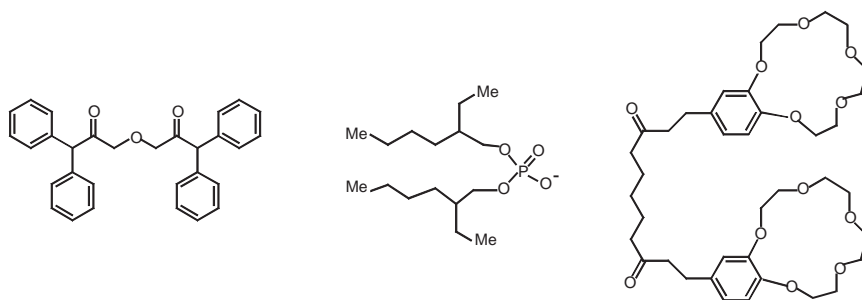


Figure 19.5 Composés organiques à usage d'ionophores.

De gauche à droite, 3 ionophores commerciaux chélatants : l'ETH 129 et le « dioctyl » phosphate, sélectifs de l'ion Ca^{++} , et à droite, l'ionophore K2 sélectif de l'ion K^+ . On retrouve une sous-structure particulière d'éther-couronne.

19.3.4 Membranes organiques à diffusion gazeuse

Quelques gaz, parmi lesquels le dioxyde de carbone (CO₂), l'ammoniac (NH₃) et le dioxyde de soufre (SO₂), ont donné lieu à la réalisation de sondes comportant des électrodes combinées pour leur dosage à l'état dissous. Ces sondes comportent une solution intérieure séparée de la solution échantillon par une membrane imperméable à l'eau et aux ions, mais qui laisse passer les molécules de gaz dissous (fig. 19.4). Pour les trois gaz cités, l'électrode spécifique comporte une électrode de verre intérieure, en contact avec une solution de bicarbonate faiblement concentrée (0,01 M), elle-même séparée de la solution à mesurer par une membrane en polymère perméable au gaz. La diffusion de celui-ci, dans le bicarbonate, provoque un changement de pH de la solution interne à proximité de la membrane. Pour d'autres gaz (HCN, HF, H₂S), le signal utile est celui qui provient de la modification de la concentration anionique au niveau de la paroi interne de la membrane.

■ La sélectivité d'une électrode vis-à-vis des autres ions est très variable. Elle est définie pour chaque ion interférant par un coefficient $K_{\text{ion spé./ion interférant}}$.

Ainsi, si on lit $K_{\text{Br/Cl}} = 2,5 \times 10^{-3}$, cela signifiera que la sélectivité de l'électrode considérée pour l'ion bromure sera $1/2,5 \times 10^{-3}$, soit 400 fois plus grande que pour l'ion chlorure.

19.4 LES CALCULS ET LES DIFFÉRENTES MÉTHODES

Plusieurs méthodes de mesures permettent de déterminer la concentration c_i d'une espèce ionique i dans un échantillon. En présence d'un ajusteur de force ionique (ISA, *Ionic Strength Adjustor*) ou d'une solution tampon qui permet, en outre de fixer le pH (TISAB, *Total Ionic Strength Adjustment Buffer*, comme dans le cas du dosage des fluorures), ces méthodes sont toutes basées sur l'application de la relation 19.3 vue précédemment. Pour un ion monovalent, à 298 K, le *facteur de pente* S qui représente le terme $2,303 RT/F$ est égal à 0,0591 V (pente théorique). C'est aussi la valeur du facteur de pente d'une électrode de verre, par unité pH.

$$E_{\text{cellule}} = E'' + \frac{0,0591}{z} \log c_i \quad (19.4)$$

Dans la pratique, à partir d'une gamme étalon, la courbe d'étalonnage $E_{\text{cellule}} = f(c_i)$ permet de trouver la pente réelle (valeur expérimentale du facteur de pente), indicative des performances du système d'électrodes utilisé.

Tableau 19.1 Valeurs de pentes idéales (298 K) pour quelques ions.

Valence	ion	pente S^* (mV/décade)
-2	S^{--}	- 29,58
-1	Cl^- , F^-	- 59,16
+ 1	Na^+ , K^+	+ 59,16
+ 2	Mg^{++} , Ca^{++}	+ 29,58

* S pour Slope (pente en anglais)

Le TISAB contient du NaCl 1M pour ajuster la force ionique, un agent complexant les métaux et un mélange tampon acide acétique/acétate de sodium.

19.4.1 Ionométrie directe

Un dosage par ionométrie directe se fait en suivant le protocole de base suivant :

On commence par préparer une série de solutions de référence par dilutions successives d'une solution mère, sans oublier d'ajouter, en excès, un volume constant du tampon ionique recommandé (ISAB ou TISAB). On détermine ensuite pour chacune d'elles la ddp de la cellule complète, afin de tracer la courbe d'étalonnage (normalement une droite), $E = f(c_i)$ en coordonnées semi-logarithmiques (fig. 19.6). Enfin, à partir de cette droite et des valeurs de ddp mesurées pour chacune des solutions échantillons préparées de la même manière, on détermine leurs concentrations en espèce à doser. La précision des résultats s'obtient à partir de l'équation 19.5 :

$$dE = \frac{RT}{zF} \cdot \frac{dC_i}{C_i} \quad \text{soit} \quad \frac{\Delta C_i}{C_i} = \Delta E \cdot \frac{zF}{RT} \quad (19.5)$$

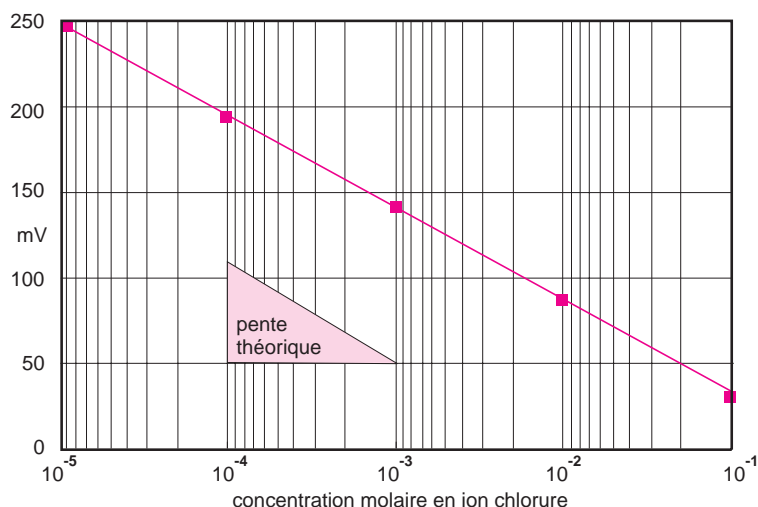


Figure 19.6 Exemple de dosage par potentiométrie directe.

La courbe d'étalonnage de l'électrode spécifique de l'ion chlorure a une pente proche de la pente théorique. La gamme de mesure des différentes électrodes spécifiques s'étend sur 4 à 6 décades suivant les ions. L'expression 19.5 permet de calculer, par exemple, qu'une incertitude de 0,2 mV conduit à une imprécision de 0,8 % sur la concentration d'un ion monovalent.

19.4.2 Méthode par ajout dosé

Seule est décrite ici la technique à un seul ajout. Elle est utile pour éliminer les effets de matrice. Elle ne nécessite qu'une solution étalon et deux mesures de potentiel. Cependant les volumes doivent être connus avec une grande précision. On commence par mesurer la ddp E_1 existant entre les deux bornes de la chaîne de mesure lorsque les deux électrodes (ESI et ERE) sont immergées dans un volume connu V_X de solution échantillon de concentration C_X en ion à doser (formule 19.4). Puis on effectue une deuxième mesure après avoir ajouté

un petit volume V_R d'une solution référence de concentration C_R en ion mesuré. Soit E_2 la nouvelle valeur. Le calcul conduit à l'expression suivante donnant C_X :

$$C_X = C_R \frac{V_R}{V_R + V_X} \cdot \frac{1}{10^{\Delta E/S} - \frac{V_X}{V_R + V_X}} \quad (19.6)$$

où S représente la pente de réponse réelle de l'électrode utilisée ($0,0591/z$, à 298 K) et $\Delta E = E_2 - E_1$, la différence de potentiel entre les deux mesures.

■ Au lieu de faire un ajout de la solution de référence, on peut faire un ajout V_X de la solution échantillon de concentration C_X à un volume donné V_R de la solution de référence de concentration C_R . Cette alternative est préférable pour les solutions échantillons relativement concentrées. A partir de la différence de potentiel ΔE déterminée et en conservant les mêmes notations, on aboutit à :

$$C_X = C_R \frac{V_X + V_R}{V_X} \cdot \left(10^{\Delta E/S} - \frac{V_R}{V_X + V_R} \right) \quad (19.7)$$

19.4.3 Titrage potentiométrique

Les électrodes sélectives ont une spécificité très variable. Les résultats gagnent en précision, quand on les utilise comme électrodes indicatrices dans des dosages potentiométriques. La concentration des ions présents et la force ionique varient en effet très peu en cours de dosage, comparativement à la concentration de l'ion à mesurer. En revanche, quand deux ions différents donnent entre eux une réaction stœchiométrique, on peut utiliser cette propriété pour les doser. Le point final du dosage est caractérisé par la disparition totale d'une des espèces ou par l'apparition d'un excès d'une des espèces, ou encore par l'apparition ou la disparition d'une espèce secondaire.

■ Ainsi pour évaluer la concentration de l'ion aluminium pour lequel il n'existe pas d'électrode spécifique, on pourra complexer cet ion sous forme de fluorure d'aluminium insoluble AlF_3 , en ajoutant du fluorure de sodium comme réactif. Le point d'équivalence sera repéré par un excès de fluorure de sodium libre qui sera détecté par la brusque variation du potentiel d'une électrode sélective de l'ion fluor. D'une manière générale un grand nombre de titrimètres automatiques, de marques concurrentes, permettent d'effectuer les nombreux dosages de ce type.

19.5 QUELQUES APPLICATIONS

Les dosages potentiométriques sont souvent utilisés pour des dosages de routine. Les dosages sont simples et la sensibilité des électrodes permet d'atteindre des concentrations de l'ordre d'une fraction de ppm. Mais avant tout dosage il faut considérer les interférants possibles.

Parmi quelques applications de routine, signalons :

- en agriculture, l'analyse des nitrates dans des échantillons de sols ;
- en agroalimentaire, l'analyse d'ions divers (NO_3^- , F^- , Br^- , Ca^{++} etc.) dans les boissons, le lait, les viandes ou les jus de fruits,

- dans l'industrie : les chlorures dans les pâtes à papier, les cyanures des bains d'électrolyse, les fluorures et chlorures en galvanoplastie, par exemple.
- dans le secteur biomédical, l'analyse de certains ions dans les sérums, fluides biologiques, salive, sucs gastriques.

■ Le capteur lambda, installé dans toutes les automobiles à pot catalytique, est une sonde à dioxygène conçue sur le principe des électrodes spécifiques. Ce capteur, qui se présente comme une bougie d'allumage, a une membrane constituée d'une gaine de zircone (ZrO_2) qui se comporte comme un électrolyte solide. La paroi externe est au contact des gaz d'échappement et la paroi interne au contact de l'air (référence). Entre ces deux parois, il apparaît une ddp, recueillie par deux électrodes, significative de la différence de concentration en dioxygène.

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.alltech.com

www.analtech.com

www.orionres.com

www.mt.com

www.ionotec.com

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 19.1

Calculer le degré de dissociation d'une solution aqueuse d'acide éthanóïque 0,85 M ainsi que son pH (on donne $K_A \text{ CH}_3\text{CO}_2\text{H} = 1,8 \times 10^{-5}$ à 20 °C).

Exercice 19.2

Sachant que le potentiel standard d'une électrode Cd/Cd^{++} vaut $-0,403 \text{ V vs ESH}$, que devient ce potentiel si l'électrode plonge dans une solution aqueuse 0,01 M de CdSO_4 ?

Exercice 19.3

On ajoute 30 mL d'une solution aqueuse 10^{-3} M d'un sel de Fe^{3+} à 20 mL d'une solution 10^{-3} M d'un sel de Ti^{3+} .

Quelles seront après réaction les concentrations molaires des sels de fer et de titane dans la solution ainsi modifiée ?

Données :

$$\text{Ti}^{3+}/\text{Ti}^{4+} = 0,2 \text{ V vs ENH} ; \quad \text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 0,77 \text{ V vs ENH} \quad \text{et} \quad \text{ENS/ENH} = +0,25 \text{ V}$$

Exercice 19.4

Retrouver l'expression ci-après utilisée dans la méthode à un seul ajout. On rappelle que C_X représente la concentration en ion à doser (volume V_X de solution à laquelle on ajoute

un petit volume V_R d'une solution référence de concentration C_R en ion mesuré). ΔE représente la différence de potentiel entre les deux mesures et S représente la pente de réponse réelle de l'électrode utilisée ($0,0591/z$, à 298 K).

$$C_X = C_R \frac{V_R}{V_R + V_X} \cdot \frac{1}{10^{\Delta E/S} - \frac{V_X}{V_R + V_X}}$$

Exercice 19.5

Pour déterminer la constante d'acidité d'un couple acido-basique HA/A^- , on mesure les absorbances à 360 nm de trois solutions S_1 , S_2 et S_3 du couple de concentration molaire $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ et de pH respectivement égaux à $\text{pH}_1 = 2$, $\text{pH}_2 = 5,5$ et $\text{pH}_3 = 8$. On trouve $A_1 = 0,1$, $A_2 = 0,4$ et $A_3 = 0,7$ en utilisant des cuves de trajet optique égal à 1 cm. En supposant que seule la forme acide est présente à pH_1 et que seule la forme basique est présente à pH_3 , calculer :

- les coefficients d'absorption molaire de la forme acide et de la forme basique.
- le pK_a de ce couple. Les approximations faites sont-elles justifiées ?

Chapitre 20

Méthodes voltampérométriques et coulométriques

Contrairement à la potentiométrie qui opère à courant nul, d'autres méthodes électroanalytiques imposent une source d'énergie externe à la solution à analyser pour provoquer une réaction électrochimique qui ne se ferait pas spontanément. Il est ainsi possible de doser toutes sortes d'ions ou composés organiques dès lors qu'ils peuvent être réduits ou oxydés électrochimiquement. La polarographie, la plus connue des méthodes voltampérométriques par suite de ses aspects particuliers, a donné naissance à des variantes menant à des techniques évoluées et très compétitives pour le dosage d'éléments, d'ions et de composés organiques à l'état de traces. La réalisation de nombreux capteurs ampérométriques, dont certains dédiés à la détection chromatographique offrent de nouveaux pôles d'intérêt à la voltampérométrie. On a regroupé ici un aperçu des méthodes les plus courantes dans ce domaine en y ajoutant la coulométrie dont le dosage de l'eau par la méthode de Karl Fischer constitue l'application la plus répandue.

20.1 GÉNÉRALITÉS SUR LA MÉTHODE VOLTAMPÉROMÉTRIQUE

La méthode voltampérométrique de dosage consiste à appliquer une différence de potentiel variable entre une *électrode de référence* (par ex. Ag/AgCl) et une électrode indicatrice, souvent appelée *électrode de travail* au contact de laquelle va se produire une réaction de type $\text{Ox} + n\text{e} \rightarrow \text{Red}$ (ou l'inverse). Lorsque le potentiel de l'électrode de travail atteint une valeur telle qu'une espèce (le *dépolarisant*) présente dans la solution étudiée, est réduite ou oxydée, l'intensité qui passe dans le circuit extérieur à cette cellule comprenant les deux électrodes croît brusquement. Dans la pratique, afin qu'aucun courant ne transite par l'électrode de référence, on utilise un montage comportant une troisième électrode appelée *électrode auxiliaire*, en métal noble ou en carbone et un électrolyte inerte (électrolyte support) pour rendre le milieu conducteur (fig. 20.1). La microélectrolyse ainsi réalisée pendant le dosage est de courte durée.

En résumé, en réalisant un balayage en tension, croissante ou décroissante, sur une plage où on attend la réduction ou l'oxydation du (ou des) analytes recherchés, on obtient une courbe intensité-potentiel, $I = f(E)$, ou *voltampérogramme*, qui va permettre d'identifier les espèces concernées et de calculer leurs concentrations. Cette électrolyse ne modifie pas de manière appréciable les concentrations des analytes dans le volume de la solution.

Les microélectrodes indicatrices les plus utilisées sont en carbone vitreux, en platine, en or ou en mercure (fig. 20.1). Elles sont polyvalentes, en ce sens qu'elles sont utilisables entre deux valeurs de potentiel qui dépendent de l'électrolyte support, du pH et de l'électrode de référence. Ainsi les limites pour une électrode de Pt sont de +0,65 V par rapport à l'électrode de référence au calomel (ESC) (oxydation de l'eau : $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) et de -0,45 V (réduction : $\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 + 2\text{OH}^-$)

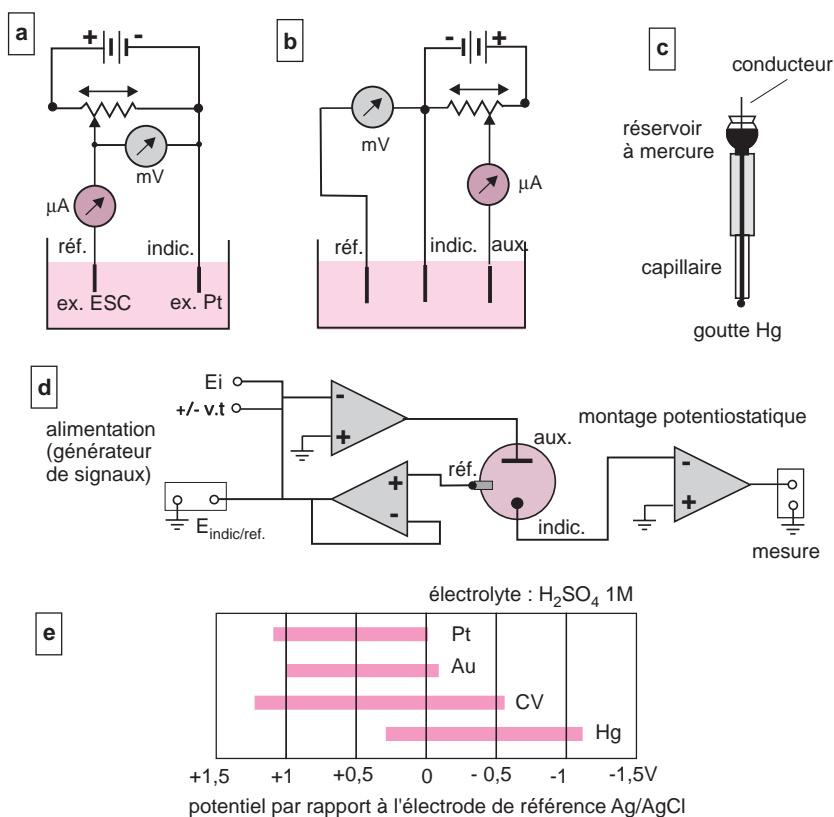


Figure 20.1 Montage de principe d'une cellule voltampérométrique.

a) À gauche, montage de base à deux électrodes, non utilisé dans la pratique car il a pour inconvénient majeur de faire passer le courant par l'électrode de référence, à éviter pour de multiples raisons ; b) montage à tension continue dans lequel aucune intensité ne passe par l'électrode de référence (par suite de son impédance élevée) ; c) un modèle d'électrode indicatrice (dites électrode de travail à goutte de mercure). Beaucoup de métaux peuvent être réduits à la surface du mercure avant que H^+ ne soit réduit à son tour ; d) schéma de raccordement avec potentiostat. Ce montage électronique permet de maintenir le potentiel d'une électrode de travail à un niveau constant par rapport à une électrode de référence ; e) domaines d'utilisation des quatre principales électrodes de travail (CV pour abréviation de *carbone vitreux*). La plage d'utilisation du mercure s'étend encore plus loin du côté cathodique dans un électrolyte comme KCl ou NaOH (-2V). Bien qu'il y ait recouvrement des plages d'utilisation entre les électrodes, leurs sensibilités, pour une même espèce, peuvent être très différentes.

20.2 L'ÉLECTRODE À GOUTTE DE MERCURE TOMBANTE

L'électrode de travail la plus originale est sans aucun doute celle qui comporte une micro-goutte de mercure comme partie active. Elle réunit des qualités et des inconvénients qui la placent hors du commun. La méthode voltampérométrique qui utilise cette électrode prend le nom de *polarographie* (inventée dans les années 1920 par Heyrovsky).

Cette électrode est constituée d'un tube de verre dont le capillaire central ($10 - 70 \mu\text{m}$ de diamètre), maintenu en position verticale, permet le transfert du mercure entre un réservoir et son extrémité. Celle-ci plonge dans la solution non agitée, contenant l'analyte et un électrolyte support. La surface de la petite goutte qui se forme augmente jusqu'à sa chute (au bout de 4 à 5 s), provoquée le plus souvent par un dispositif produisant un léger choc sur l'électrode. Une nouvelle goutte identique remplace la précédente, présentant une surface renouvelée et non contaminée. Le mercure est vite limité vers les potentiels positifs (+0,25 V par rapport à l'ESC). Au-delà, il s'oxyde à son tour. En revanche, vers les potentiels négatifs, il est utilisable jusqu'à $-1,8$ ou $-2,3$ V selon que l'électrolyte support est acide ou basique. Cette plage donne beaucoup de possibilités en analyse, notamment pour les métaux lourds. Le mercure doit être très pur (hexadistillé, et conservé sous azote). Cependant son utilisation, compte tenu de sa toxicité, constitue un réel handicap pour cette technique. Après usage il est récupéré pour être recyclé.

20.3 POLAROGRAPHIE À COURANT CONTINU

Dans l'expérience de base — maintenant rarement utilisée — on applique à la goutte de mercure, une tension variable continue E_{indic} , fonction linéaire du temps, dont l'incréméntation (ou vitesse de balayage) est de l'ordre de 1 à 2 mV/s à partir du potentiel initial E_i choisi.

$$E_{\text{indic.}} - E_{\text{réf}} = E_i \pm v \cdot t \quad (20.1)$$

Le signe \pm signifie que le balayage peut se faire dans le sens anodique ($v > 0$) ou cathodique ($v < 0$). Le *polarogramme* résultant, courbe $I = f(E)$, présente un ou plusieurs paliers (fig. 20.2). La hauteur d'un palier, correspondant au courant limite de diffusion i_D (cf. § 20.4), est fonction de la concentration du dépolarisant (l'analyte, qui est réduit au contact du mercure) et permet donc une exploitation quantitative. Le *potentiel de demi-vague*, déterminé à la mi-hauteur $i_D/2$ du palier, est caractéristique de chaque analyte et permet une exploitation qualitative du polarogramme. Plusieurs espèces en présence dans une solution peuvent donc être étudiées au cours d'une même analyse, à condition que les potentiels de demi-vague soient suffisamment distincts. Ce tracé montre aussi une structure fine en dents de scie qui provient du renouvellement des gouttes.

Il est essentiel d'éliminer toute trace de dioxygène dissous dans la solution par barbotage de diazote par exemple, sinon la polarogramme serait rendu inexploitable par suite de la réduction du dioxygène en eau selon les deux étapes qui sont détaillées dans la figure 20.6.

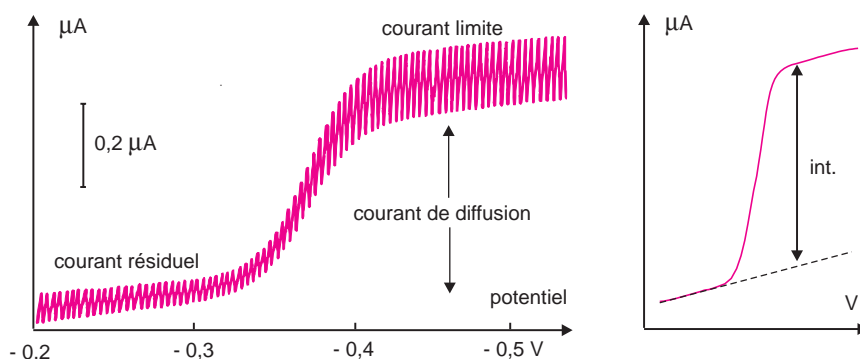


Figure 20.2 La vague polarographique.

Polarogramme d'une solution à 10 ppm de Pb^{++} dans KNO_3 0,1 M, obtenu avec une électrode à goutte de mercure croissante. La position médiane de la vague (ici -0,35 V) est caractéristique du plomb et la hauteur du palier, de sa concentration. Pour un meilleur rendu de la courbe, les oscillations sont ici amorties. À droite, construction graphique pour la mesure de i_D . Seule l'enveloppe du polarogramme a été représentée (oscillations absentes).

■ Un avantage de la voltampérométrie sur l'absorption atomique, est qu'il est possible de distinguer un élément sous des états de valence différents, par exemple le fer Fe^{2+} du Fe^{3+} , donc de les doser séparément (cf. fig. 20.4). Certains groupements organiques sont également électroactifs, par conséquent analysables par cette méthode.

20.4 LE COURANT DE DIFFUSION

L'aspect particulier de la vague polarographique peut s'expliquer comme suit. Supposons que la solution contienne un sel de plomb très dilué dans un électrolyte-support dont la concentration est très supérieure à celle du Pb^{++} à analyser. On applique à l'électrode indicatrice une tension négative croissant linéairement à partir d'une valeur inférieure à celle qui est nécessaire pour réduire le cation Pb^{++} . À partir de -0,35 V (vs. Ag/AgCl), les ions Pb^{++} sont réduits au contact de la goutte. Mais les ions K^+ , non réductibles à ce potentiel, forment autour de la goutte de mercure un écran empêchant la migration normale des ions Pb^{++} de la solution. Cependant, sous l'effet du gradient de concentration, les ions Pb^{++} vont tenter de parvenir à la surface de l'électrode — où ils seront réduits — uniquement par diffusion au travers d'une couche d'ions K^+ . Ce phénomène est à l'origine du *courant de diffusion*. Le courant limite moyen de diffusion i_D , dû pour l'essentiel au flux des ions de l'analyte considéré à l'instant qui précède la chute de la goutte, dépend de plusieurs paramètres, dont la « constante du capillaire » :

$$\bar{i}_D = 607 \cdot n \cdot D^{1/2} \cdot m^{2/3} \cdot t^{1/6} \cdot C \quad (20.2)$$

i_D sera exprimé en μA avec les unités suivantes : D , coefficient de diffusion de l'ion (cm^2/s), m , débit massique en mercure (mg/s), t , durée de vie de la goutte (s), C , concentration (mmol/cm^3). n , nombre d'électrons transférés au cours de l'électrolyse de l'ion (i_D sera en ampères (A) avec D en m^2/s , m en kg/s , t en secondes et C en mol/m^3). Le coefficient 607 est établi pour 25 °C.

Dans la pratique des dosages, cette expression — connue sous le nom d'équation d'Ilkovic et qui rend compte de l'influence de certains facteurs, est remplacée par la formule simplifiée 20.3 dans laquelle K regroupe les paramètres propres à la méthode suivie et à l'appareil utilisé, ce qui en fait une constante pour un dosage donné.

$$i_D = K \cdot C \quad (20.3)$$

L'intensité transitant par la goutte résulte de plusieurs effets parmi lesquels :

- le *courant capacitif* (ou courant résiduel). Il fait de l'interface goutte/électrolyte support l'analogue d'un condensateur par la fixation d'électrons en regard des ions de l'électrolyte support non réduits (ex. K^+). Ce courant « non faradique » diminue très vite au cours du temps, car il dépend de la variation de surface dS/dt de la goutte, qui décroît quand la goutte grossit.
- le *courant de diffusion* (ou courant faradique). Si la surface de la goutte ne variait pas il devrait décroître comme \sqrt{t} . Néanmoins il augmente compte tenu de la tension croissante appliquée à la goutte et de l'accroissement de sa surface. L'expansion de sa surface fait plus que compenser l'appauvrissement en substance électroactive au voisinage de l'électrode. La courbe représentative de l'intensité a finalement l'aspect reporté sur la figure 20.3.

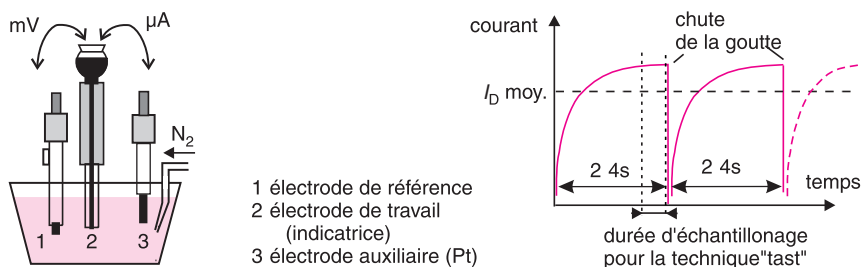


Figure 20.3 Cellule de polarographe et courant de diffusion.

La solution doit être débarrassée du dioxygène dissous, omniprésent, qui conduit à une double vague gênante. Aspect du courant de diffusion, fonction croissante du temps pour chaque goutte de mercure, dans une **solution non agitée**. La polarographie directe est une méthode lente. L'enregistrement d'un voltampérogramme nécessite au moins une centaine de gouttes. L'équation d'Ilkovic permet de calculer i_D max. si on remplace le coefficient 706 par 607 dans l'équation 20.2.

- La technique qui consiste à ne mesurer l'intensité que pendant un court instant, tard dans la vie de la goutte (technique Tast), évite le tracé en dents de scie, mais conduit à une moindre sensibilité puisque le courant de diffusion diminue comme le flux de l'analyte qui va du cœur de la solution vers la surface de la goutte (fig. 20.3).

20.5 POLAROGRAPHIE À IMPULSIONS

Pour améliorer la sensibilité et pour distinguer des analytes dont les potentiels de demi-vague ne diffèrent que de quelques dizaines de mV, on soumet la goutte de mercure, non plus à une tension en croissance monotone mais à des impulsions. Les deux principales techniques sont les suivantes.

20.5.1 Polarographie impulsionnelle normale (NPP)

Pour éliminer l'aspect dentelé du polarogramme classique, on remplace la rampe de balayage précédente par une série de brèves impulsions de potentiel (entre 50 à 100 ms), dont les valeurs vont en croissant mais commençant à une même tension de base qui ne provoque pas de réaction redox sur l'analyte (fig. 20.4). Ces impulsions sont produites au rythme forcé du renouvellement des gouttes de mercure (entre 2 et 4 s). Une seule mesure de l'intensité est faite juste avant la chute de chaque goutte. A cet instant le courant faradique de diffusion est stabilisé et le courant capacitif est devenu négligeable. La sensibilité de la méthode de base se trouve accrue de 2 ou 3 décades.

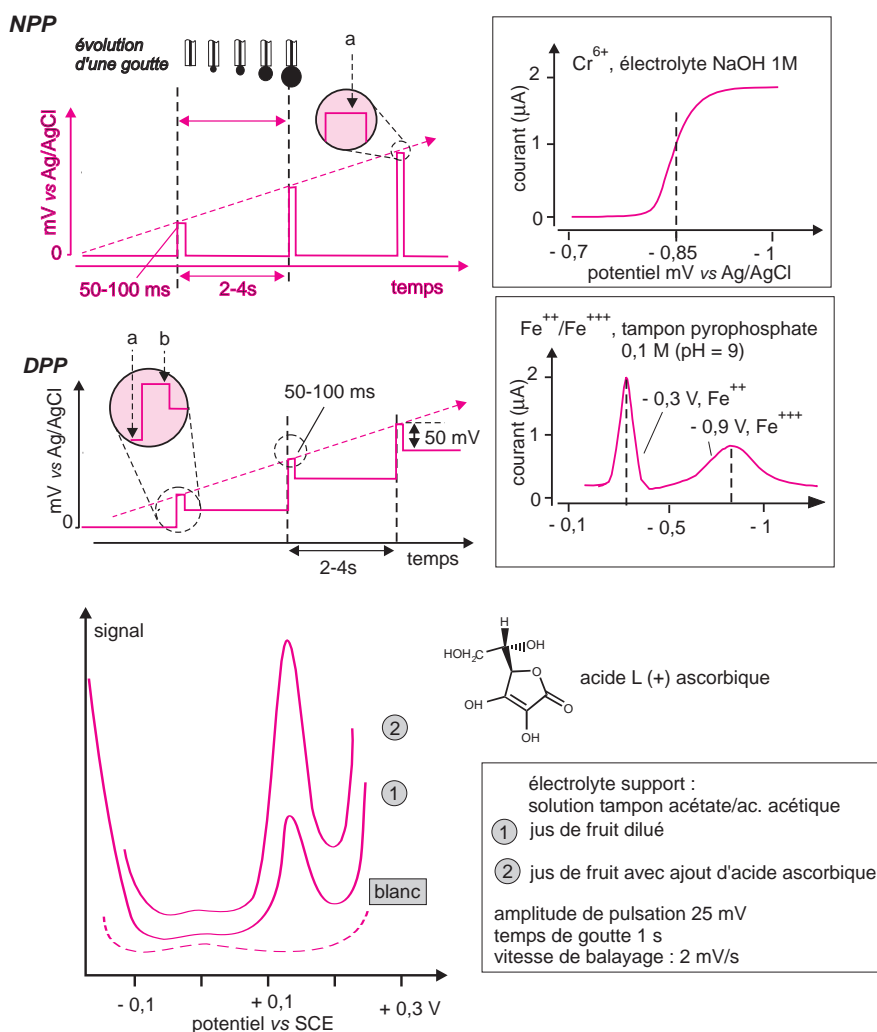


Figure 20.4 Polarographie à impulsions.

Techniques NPP et DPP. Le dessin de l'extrémité de l'électrode de travail avec une goutte en formation montre à quel moment les mesures sont faites (voir les flèches a et b). Exemples de dosages. Le dosage de l'acide ascorbique (vitamine c) dans un jus de fruit (voir conditions) correspond à une oxydation sur l'électrode de travail.

20.5.2 Polarographie impulsionnelle différentielle (DPP)

On applique à l'électrode de travail une tension qui correspond pour chacune des gouttes de mercure successives à une impulsion de même amplitude (50 mV) mais partant d'une tension de base plus grande. Chaque goutte, en fin de vie, fait l'objet de deux mesures d'intensité, la première juste avant l'impulsion et la seconde avant qu'elle ne tombe (fig. 20.4). Le graphe de la différence des intensités en fonction de la tension revêt l'aspect d'un pic dont la hauteur est proportionnelle à la concentration de l'analyte.

20.6 DÉTECTION VOLTAMPÉROMÉTRIQUE EN CLHP ET ECHP

La méthode voltampérométrique a été adaptée à un mode de détection très sensible des composés électroactifs en chromatographie liquide (si la phase mobile est conductrice) et en électrophorèse capillaire. On dispose de cellules miniaturisées comportant les 3 électrodes classiques dont une électrode de travail portée à un potentiel défini par rapport à une l'électrode de référence. La cellule est balayée par la phase mobile sortant de la colonne (fig. 20.5).

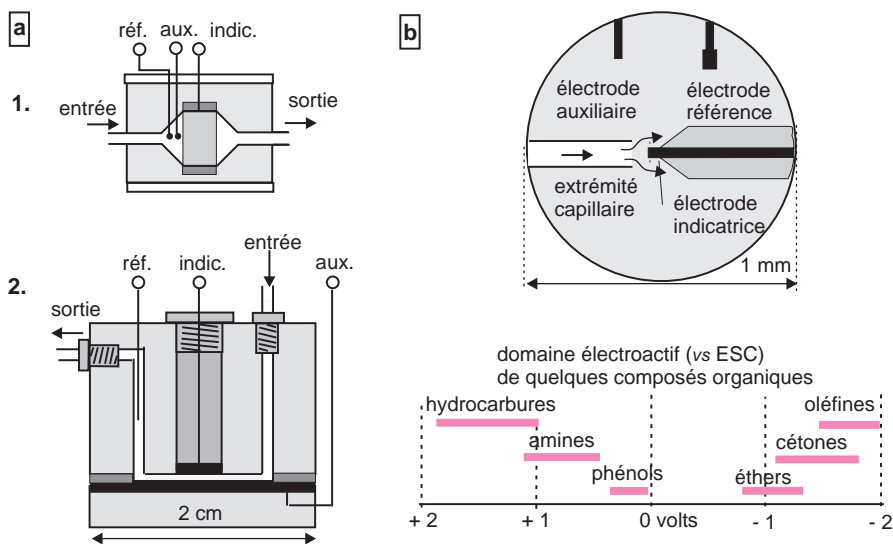


Figure 20.5 Détection voltampérométriques en CLHP et ECHP.

a) Deux modèles de cellules voltampérométriques. L'électrode indicatrice, en graphite poreux, de grande surface, travaille dans les conditions coulométriques. La circulation de la phase mobile au niveau de l'électrode indicatrice assure le renouvellement des espèces électroactives ; b) détail au niveau de l'extrémité du capillaire en ECHP. L'électrode de travail reçoit les ions sortant du capillaire. La cellule n'est pas matérialisée. Elle se trouve réunie avec le compartiment cathodique de l'appareil. En dehors des phénols, amines aromatiques et thiols, peu de molécules analytiquement importantes sont électroactives.

20.7 CAPTEURS DE TYPE AMPÉROMÉTRIQUES

Les dosages voltampérométriques ne sont pas pratiqués dans le seul environnement classique des laboratoires d'analyse. Les applications sont plus nombreuses qu'il n'y paraît. Un grand nombre d'instruments de contrôle, portatifs ou non, destinés à faire des mesures précises de composés présents dans les mélanges de gaz ou de vapeurs ou des solutions, sont équipés de capteurs électrochimiques basés sur le principe de la cellule ampérométrique à 2 ou 3 électrodes. Quelques capteurs de ce type sont étudiés ci-après.

20.7.1 Sonde à dioxygène de Clark

La réduction électrochimique du dioxygène au contact d'une électrode est à l'origine de plusieurs modèles de capteurs qui diffèrent par les réactions mises en jeu. Le plus classique est sans doute le capteur de Clark pour le dioxygène dissous, qui comporte une anode en argent et une cathode en platine (l'électrode de travail), toutes deux baignant dans un électrolyte à base de KCl (fig. 20.6). Cette cellule est séparée de l'échantillon par une membrane de téflon perméable au dioxygène, ce qui permet à ce gaz d'atteindre la cathode distante de la membrane d'environ 20 μm . On applique une ddp de 1,5 V entre les deux électrodes, la cathode étant ainsi portée à un potentiel négatif suffisant pour réduire totalement le dioxygène (réactions 1 et 2). L'intensité dans le circuit extérieur croît proportionnellement à la quantité de gaz migrant à travers la membrane, et par suite à sa concentration en solution (loi de Faraday).

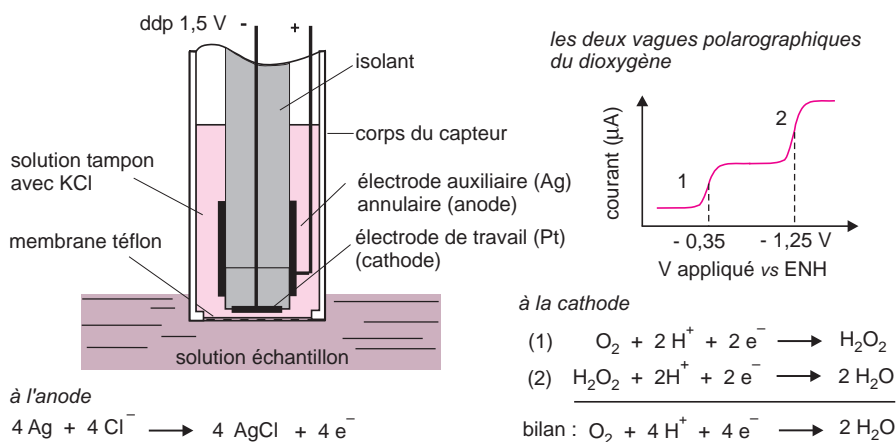


Figure 20.6 Une cellule à deux électrodes concentriques, de type Clark pour le dosage du dioxygène.

La membrane en téflon perméable au dioxygène, est très proche de la cathode pour que la double diffusion à travers la membrane et ensuite dans le film liquide conduise à un signal stable au bout de 10 à 15 secondes.

■ La fabrication des capteurs électrochimiques a considérablement évolué et l'offre s'est diversifiée. Les trois électrodes du capteur pris comme exemple ici résultent d'une technique de fabrication propre aux circuits de microélectronique. Complété par une membrane et un électrolyte convenable, ce capteur permet de doser le chlore dissous dans l'eau. Il est basé sur l'oxydation de l'ion ClO^- (acide hypochloreux). La limite de détection est de 1 ppbV (fig. 20.7).

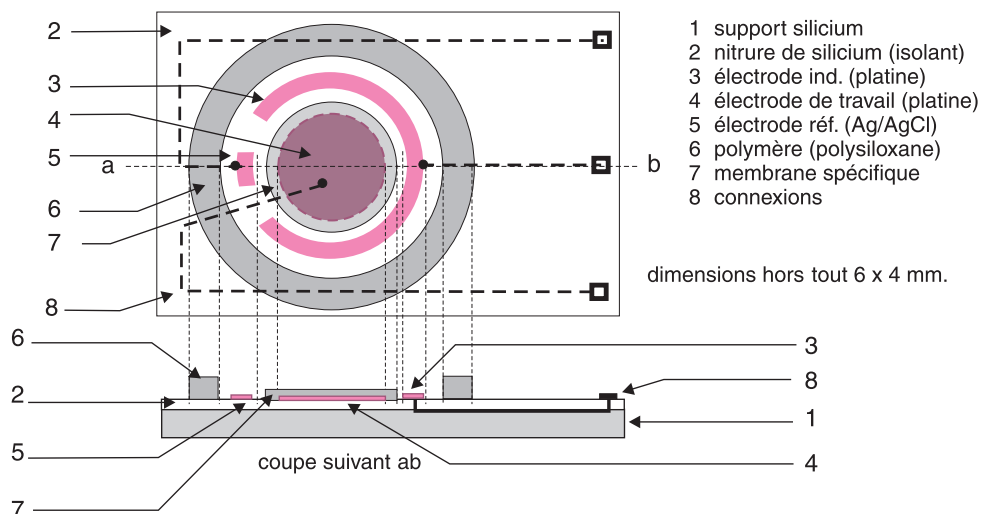


Figure 20.7 Capteur issu d'une technique de microlithographie.

Capteur pour doser le chlore en milieu aqueux. Dessin exécuté d'après un document de la société Microsens (CH). Capteur MAES-2402 Dans le dessin en coupe, les épaisseurs des circuits ne sont pas à l'échelle. Cet ensemble est destiné à être complété par le reste du capteur (électrolyte, connexions).

20.7.2 Autres capteurs pour gaz (*Amperometric Gas Sensors*)

Beaucoup de capteurs AGS sont bâtis de la même manière. Ayant l'aspect extérieur d'une pile électrique (fig. 20.8) ce sont des cellules électrochimiques comportant un électrolyte immobilisé et les trois électrodes classiques (de travail, auxiliaire et de référence). Quand le capteur est exposé au mélange gazeux contenant l'espèce électroactive pour laquelle il a été conçu, celle-ci est oxydée ou réduite selon les cas, à un potentiel contrôlé par rapport à celui de la référence au moyen d'un potentiostat, ce qui produit un transfert d'électrons entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire. Le potentiostat permet de modifier les potentiels d'électrode, donc de doser des analytes différents avec un même appareil à condition de changer de détecteur.

Sensibles et ayant un temps de réponse rapide lorsque l'électrode de travail est recouverte d'un dépôt catalytique, ils sont utilisables sur une gamme de concentration étendue (4 décades). En revanche, ils fonctionnent pour un domaine de température assez restreint ($-10/ + 40\text{ }^{\circ}\text{C}$), nécessitent des ré étalonnages et doivent être périodiquement changés, car ils s'usent et se polluent avec le temps. Enfin on peut toujours craindre un manque de sélectivité.

Pour certains gaz deux électrodes suffisent : ainsi la figure 20.9 illustre le principe de deux capteurs, l'un pour le monoxyde de carbone (CO) l'autre pour le dioxygène (O_2). Les électrolytes sont bien sûr adaptés aux cellules. Ainsi pour le CO on utilise un acide minéral fort, tel l'acide sulfurique et pour O_2 une solution faiblement alcaline, à base d'acétate de potassium. Ces électrolytes liquides sont immobilisés par des matériaux absorbants.



Figure 20.8 Capteurs ampérométriques pour gaz (Amperometric Gas Sensors). Assortiment de capteurs de la société ATMI Sensoric Div. (Ger.). Modèle GasAlertMax3-DL de la société BW Technologies (Can.); La photo centrale montre le compartiment où sont rangés les 4 détecteurs spécifiques aux 4 gaz détectables simultanément. Après avoir franchi une barrière de diffusion spécifique afin de ne pas saturer le capteur, le gaz est oxydé (CO , H_2S , NO , H_2 , HCN) ou réduit (Cl_2 , NO_2) en présence de l'électrolyte au contact d'une électrode dite de travail de grande surface.

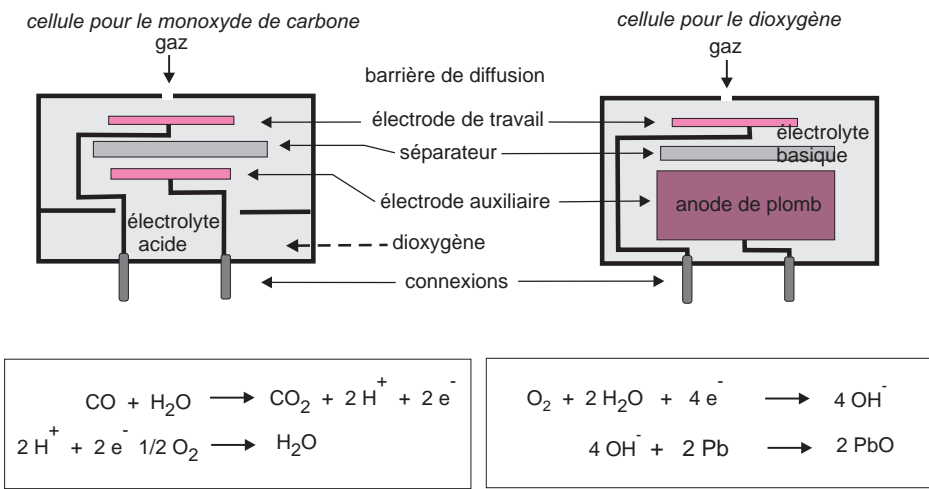


Figure 20.9 Deux modèles de cellules à deux électrodes pour le monoxyde de carbone et le dioxygène. Il en est de ces cellules comme des piles et batteries : elles s'usent à l'usage. En plus des composés détectés, les réactions électrochimiques consomment des espèces présentes dans la cellule. Il peut s'agir de l'électrolyte ou de l'anode elle-même (cas de la cellule pour le dioxygène), ou encore d'un réactif qui doit être présent (un apport de dioxygène peut être nécessaire pour la cellule au monoxyde de carbone).

20.7.3 Biocapteurs à détection ampérométrique

Un biocapteur est constitué d'un composé d'origine biologique (enzyme, anticorps) choisi en fonction de l'analyte et d'un système comportant des électrodes pour convertir le signal biologique (ex. fixation de l'antigène sur l'anticorps) en signal électrique extérieur.

Pour le rendre spécifique d'un analyte on utilise généralement une paroi perméable comportant une couche de reconnaissance piégeant l'enzyme qui sert à la fois de catalyseur à la transformation de l'analyte recherché et de piège provisoire à électrons. Il peut s'agir, par exemple, d'un système sandwich dans lequel l'enzyme est immobilisée entre une membrane externe en acétate de cellulose, pour empêcher le passage des grosses molécules présentes et une membrane interne de polycarbonate qui laisse filtrer le produit vers l'électrode.

Le dosage du glucose sanguin avec l'aide d'appareils portables, utiles aux diabétiques, a fait l'objet d'un grand nombre de réalisations depuis 1960. Toutes mettent en œuvre la *glucose oxydase* (GOX) et soit le dioxygène, soit un médiateur tel une quinone, soit un polymère conducteur assurant le transport d'électrons (fig. 20.10).

■ Pour ce dosage, plusieurs générations de capteurs se sont succédés. Le principe est le suivant : pour oxyder le glucose en gluconolactone, qui est la réaction-clé adoptée, on fait appel à la glucose oxydase (GOX) enzyme comportant un site prosthétique à base de flavine qui sert de piège provisoire à électrons, en passant de sa forme oxydée (FAD) à sa forme réduite (FADH₂). Deux protons et deux électrons sont cédés à l'enzyme qui se trouve ainsi réduite. Pour retrouver son état initial oxydé, on fait réagir soit une molécule de dioxygène, avec formation d'une molécule de peroxyde d'hydrogène (première génération), soit un oxydant (appelé médiateur, ex. quinone) qu'il est aisé de mélanger à l'enzyme à une concentration connue (deuxième génération). Ce second procédé améliore la sélectivité du dosage.

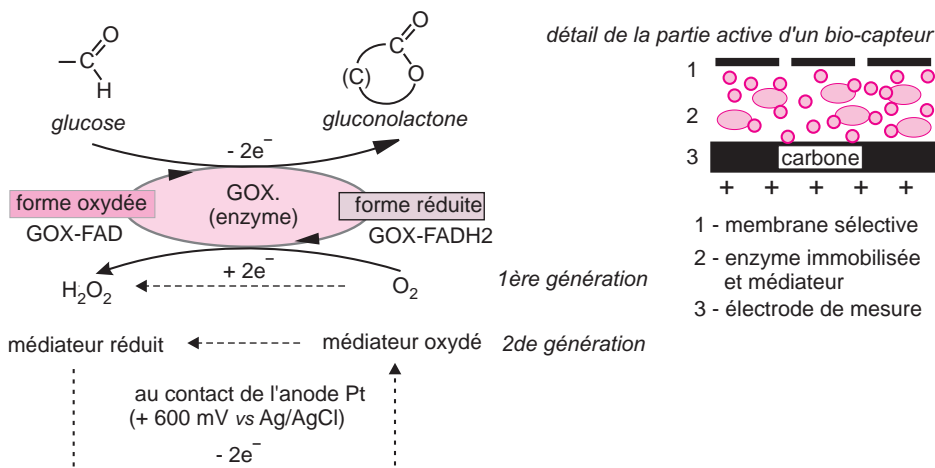


Figure 20.10 Dosage ampérométrique du glucose.

À gauche, réactions mises en jeu dans les appareils de 1^{ère} ou de 2^{ème} génération. O₂ ou le médiateur sont nécessaires car ce sont de petites molécules qui parviennent jusqu'au groupement prosthétique de l'enzyme, qui ne pourrait être au contact de l'électrode de platine. Le médiateur peut être également un système redox à base d'osmium immobilisé dans un polymère. Pour suivre la réaction on peut quantifier par ampérométrie la consommation de dioxygène ou la formation de H₂O₂ ou la régénération du médiateur.

Les capteurs précédents mettent en jeu des réactions au contact d'une électrode de travail. Il s'agit d'une catégorie de capteurs électrochimiques parmi d'autres. Tout en restant dans le domaine des bio-capteurs, on rencontre d'autres formes de détection. Ainsi on peut utiliser une uréase pour transformer l'urée en ions ammonium qui seront détectés par une *électrode sélective* à cet ion, ou encore une pénicillinase qui détruira la pénicilline avec apparition d'ions H^+ détectés par une *électrode pH*.

■ Un type original de biocapteur calqué sur le principe d'un transistor à effet de champ (TEC), consiste à remplacer la grille de ce transistor par une membrane comportant une enzyme adaptée à la transformation d'un analyte particulier (fig. 20.11). La réaction chimique au contact de l'enzyme fera apparaître des charges au niveau de la couche isolante (silice), donc la valeur de la conductance entre la source et le drain de ce transistor. La mesure sera soit ampérométrique soit potentiométrique.

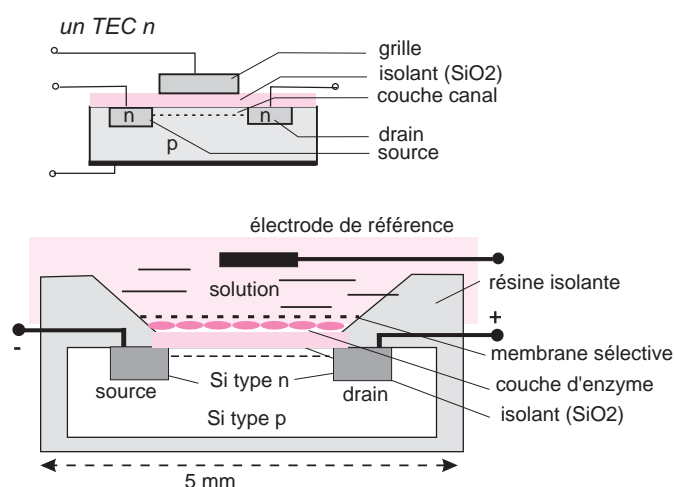


Figure 20.11 Une électrode sélective conçue sur le principe d'un transistor à effet de champ. En plaçant une enzyme au contact de l'électrode, il est possible de suivre une réaction particulière, la surface de la silice (présence de fonctions silanols) étant particulièrement sensible aux ions H^+ .

20.8 VOLTAMPÉROMÉTRIE À REDISSOLUTION (STRIPPING VOLTAMMETRY)

Les méthodes à redissolution anodique (ou cathodique) sont des techniques très sensibles utilisées pour doser les traces de métaux. Elles se font en deux étapes.

► **Électrolyse.** Sur une électrode portée à un potentiel constant, plongeant dans la solution agitée, on dépose, en 1 à 30 min, une fraction des analytes électroactifs présents dans l'échantillon. L'électrode au contact de la solution peut revêtir des formes variées : goutte de mercure pendante (non renouvelée) ou cylindre en carbone vitreux recouvert d'un film de mercure ou électrode tournante à disque de carbone avec un ajout d'un sel de mercure dans la solution. Dans tous les cas il se forme sur la surface de l'électrode, avec les analytes métalliques M^{n+} , des amalgames $M(Hg)$.

► **Redissolution.** Après électrodéposition, on diminue progressivement la ddp entre les deux électrodes, de travail et de référence. La réversibilité des réactions redox conduit à une oxydation électrochimique des analytes (fig. 20.12). Les éléments sont identifiés par leur potentiel d'oxydoréduction. Dans l'exemple choisi, il s'agit d'un dosage par voltampérométrie anodique. Combinée à la technique impulsionnelle différentielle (DPP) c'est maintenant la méthode voltamétrique la plus universelle et donc la plus utilisée. Les appareils actuels dont tous les paramètres sont contrôlables par logiciel facilitent la pratique de ces dosages et offrent ainsi une alternative moins coûteuse aux méthodes spectroscopiques telle l'émission atomique.

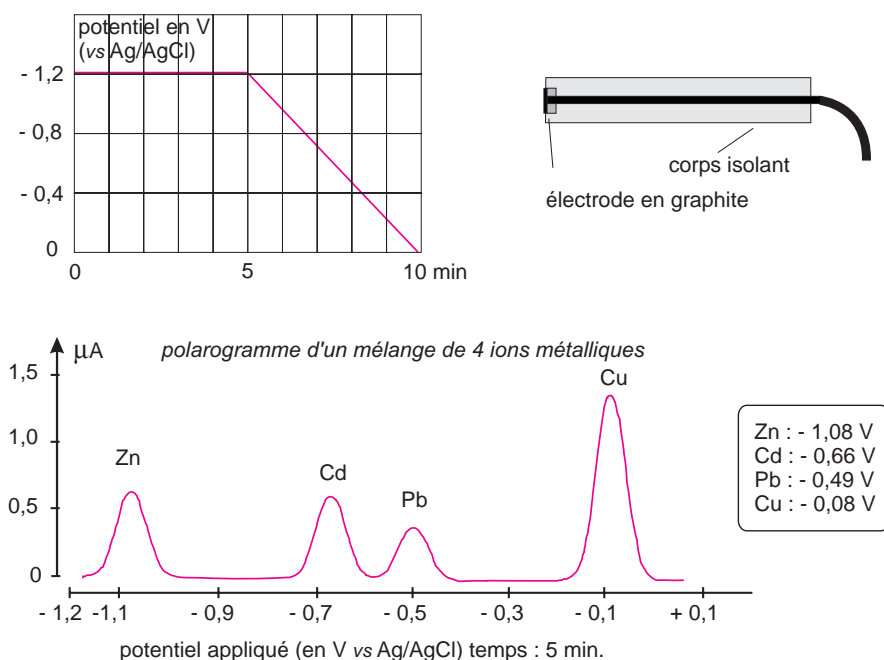


Figure 20.12 Voltampérométrie à redissolution.

Programmation linéaire du potentiel de l'électrode de travail. Exemple d'électrode et analyse de quatre métaux présents dans un échantillon d'eau de mer par polarographie impulsionnelle différentielle (programmation de potentiel comme pour une DPP).

20.9 DOSAGES COULOMÉTRIQUES À COURANT OU À POTENTIEL CONSTANT

Les méthodes décrites précédemment correspondent à des électrolyses partielles des analytes au contact de la microélectrode de travail. Les méthodes coulométriques au contraire, sont basées sur la conversion quantitative des analytes. S'il en est ainsi, la concentration d'un analyte est calculée par application de la théorie, sans qu'il soit besoin de faire un étalonnage. Il ne s'agit donc pas d'une méthode comparative. La sélectivité est parfois moyenne et la méthode est lente. Deux types de méthodes coulométriques co-existent :

- la méthode *potentiostatique*, dans laquelle on maintient le potentiel de l'électrode de travail, ce qui évite les réactions parasites. Le courant décroît à mesure que l'analyte disparaît de la solution. Il faut un intégrateur électronique pour connaître la quantité de courant utilisée.
- la méthode *ampérostatique*, dans laquelle l'intensité est maintenue constante, par un ampérostatisateur, au cours du dosage jusqu'au signal qui marque la fin de la réaction de l'analyte. C'est la forme de dosage coulométrique la plus simple. Il existe beaucoup d'appareils commerciaux de ce type. Les titrimètres coulométriques comportent une cellule avec une électrode génératrice de grande surface et une électrode auxiliaire séparée par un diaphragme du compartiment de réaction. Ce compartimentage de la seconde électrode évite que les espèces formées à son contact ne viennent éventuellement réagir sur le réactif formé au niveau de l'électrode de travail (fig. 20.13).

Il arrive assez souvent que la transformation directe et totale de l'analyte soit difficile parce que le produit formé s'accumule au contact de l'électrode, ce qui produit sa polarisation. On évite ce problème en ajoutant un précurseur en large excès destiné à libérer un réactif intermédiaire dont on sait qu'il réagit sur la totalité de l'analyte. Ainsi le composé à analyser ne participe pas directement dans le processus de transfert d'électrons.

■ À titre d'exemple, le dosage des ions Cl^- pourra se faire à partir des ions Ag^+ générés à la surface d'une anode en argent. La quantité de courant utilisée, en coulombs, permet le calcul précis de la quantité d'analyte transformé, à condition que le courant ne serve qu'à la formation des ions Ag^+ . Ces dosages n'exigent pas de solutions standard. On détermine la quantité absolue d'ions formés à partir du courant consommé. On considère que la quantité de courant $Q(C) = i(A) \cdot t(s)$ correspond au seul analyte.

20.10 LE DOSAGE DE L'EAU D'APRÈS LA MÉTHODE DE KARL FISCHER

Beaucoup de produits manufacturés, de solvants et de matières premières, font l'objet du dosage de leur teneur en eau ou « taux d'humidité ». Parmi toutes les méthodes possibles, celle de Karl Fischer est très employée puisqu'on estime à environ 500 000 le nombre de titrages de ce type effectués chaque jour dans le monde.

Ce dosage, considéré comme universel, met en jeu des réactions chimiques alliées à une forme de détection électrochimique. Les appareils dédiés à ce dosage sont soit des potentiographes (titrimètres), soit des coulomètres munis d'une cellule à diaphragme. Cette dernière méthode, plus sensible, est adaptée au dosage de très faibles concentrations en eau (de l'ordre du mg/L).

■ Les applications sont nombreuses : produits agroalimentaires de toute sorte, solvants, gaz, pétrole, etc. Les produits solides insolubles doivent, préalablement au dosage, être soit réduits en poudre, soit extraits avec des solvants anhydres, soit entraînés azéotropiquement ou bien encore être chauffés pour en faire partir l'eau. Les seuls cas difficiles sont les produits très basiques ou très acides qui dénaturent le réactif ainsi que les cétones et aldéhydes qui perturbent le titrage par formation d'acétals (on utilise alors des réactifs spéciaux).

20.10.1 Les réactions mises en jeu

En présence d'eau, l'iode réagit sur le dioxyde de soufre, pour conduire à une réaction d'oxydoréduction, spécifique à ces trois composés :

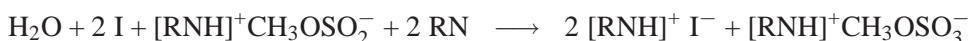


Cette réaction quantitative de l'eau peut servir ainsi à la doser. On y parvient si, par exemple, on ajoute une base pour neutraliser les acides formés et déplacer ainsi l'équilibre –K. Fischer utilisait la pyridine.

L'iode étant un solide et le dioxyde de soufre un gaz, on utilise un solvant auxiliaire polaire qui sert à la fois de diluant et de milieu réactionnel. On prend généralement le méthanol et plus rarement le monoéther méthylique du glycol (ou du diéthylèneglycol). Dans ces conditions le dioxyde de soufre interagit avec le solvant. Ainsi avec le méthanol, il se forme de l'hydrogénosulfite de méthyle qui devient l'espèce active sur l'iode en présence d'eau :



Contrairement à la première réaction écrite, en présence de méthanol, *une seule* molécule d'eau réagit sur *deux* atomes d'iode. L'hydrogénosulfite de méthyle est oxydé en hydrogénosulfate, transformé en présence de base de type RN en un sel d'ammonium. Finalement la réaction de Karl Fischer peut être reformulée ainsi :



Avec la pyridine, il y a formation du sel de pyridinium $\text{C}_5\text{H}_5\text{NH}^+ (\text{CH}_3\text{OSO}_3)^-$. Cette base, d'odeur très désagréable, est maintenant remplacée par l'imidazole ou la diéthanolamine, inodores, et conduisant à des réactifs commerciaux plus stables.

La présence de vapeur d'eau atmosphérique devant être évitée, le récipient du dosage est isolé de l'atmosphère par des tubes de séchage. En outre, le solvant de dilution n'étant que très rarement anhydre, par suite de son caractère hygroscopique, il faut déterminer sa teneur en eau, préalablement au dosage. La détection du point d'équivalence est effectuée par une méthode électrique plutôt que visuelle, en décelant la brusque variation de tension aux bornes de deux petites électrodes polarisées de platine qui plongent dans le milieu réactionnel (fig. 20.13).

Le réactif, mélange de dioxyde de soufre, d'iode et de la base, est caractérisé par le *nombre de mg d'eau* qui peuvent être neutralisés par 1 mL du réactif, ce qu'on appelle la concentration massique équivalente en eau ou encore *titre T* du réactif.

20.10.2 Adaptation coulométrique du dosage de Karl Fischer

Pour obtenir une bonne précision avec la technique ci-dessus, il faut au moins 10 mg d'eau dans l'échantillon, étant donné l'ordre de grandeur du titre *T* du réactif commercial de KF (quelques mg/mL). Si les quantités d'eau sont plus faibles (jusqu'à 10 µg d'eau), on fait appel à la méthode coulométrique.

Les instruments automatisés pour effectuer ce dosage sont donc proposés en deux versions, l'une dite *normale* et l'autre dite *coulométrique*.

Dans cette seconde variante, l'iode nécessaire au dosage est généré à partir d'un précurseur, au fur et à mesure par voie électrochimique à l'aide d'impulsions électriques appliquées aux électrodes : le réactif de KF modifié en conséquence, contient un iodure (le précurseur) qui est oxydé en diiode au contact de l'anode. Cette cellule à électrolyse est munie d'un diaphragme entre les compartiments anodique et cathodique (fig.20.13). À l'anode, l'ion iodure s'oxyde en iode ($2\text{I}^- \longrightarrow \text{I}_2 + 2\text{e}^-$), une mole d'eau nécessitant deux faradays. Le volume de réactif KF qui sert dans le calcul de concentration dans la méthode classique, est remplacé par la mesure, plus précise, d'une quantité de courant, sachant qu'1 mg d'eau équivaut à 11,72 coulombs

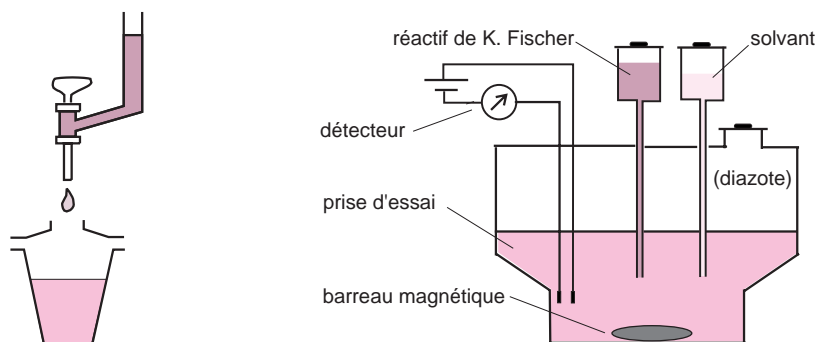


Figure 20.13 Dosage de l'eau par la méthode de K. Fischer.

Un dosage conventionnel à la burette avec détection visuelle du point d'équivalence conduirait à des résultats imprécis. On utilise une cellule comportant deux petites électrodes de platine. Tant qu'il n'y a pas d'iode libre en solution, les électrodes restent polarisées et il ne circule donc qu'un faible courant. Dès que le point d'équivalence est atteint, l'iode en excès entraîne la dépoliarisation des électrodes et le microampèremètre révèle alors le passage d'un courant plus intense.

20.11 CONDUITE D'UN DOSAGE SELON LA MÉTHODE DE KARL FISCHER

Le dosage est conduit en deux étapes. On commence par déterminer l'équivalence en eau du réactif de KF (titre T), puis on dose l'eau contenue dans l'échantillon. Les différentes opérations se font à la suite, dans une cellule de mesure spéciale, à l'abri de l'atmosphère.

Comme pour beaucoup de dosages volumétriques, il est possible de suivre une voie de *dosage direct*, ou bien une voie de *dosage en retour*. Dans la voie directe on atteint le point d'équivalence en ajoutant juste la quantité nécessaire de réactif de Karl Fischer (appelé KF dans la suite du texte). Dans la voie en retour, on ajoute un excès de ce réactif, avant d'en doser l'excès en utilisant le solvant non anhydre dont on a déterminé la teneur en eau par un pré-titrage, et qui a été placé dans la burette.

20.11.1 Dosage préliminaire du réactif de Karl Fischer

► Par dosage direct

On introduit dans le récipient du dosage, un volume V_1 de solvant (soit ici le méthanol). Soit V_2 le volume de réactif nécessaire pour atteindre le point d'équivalence (on fait ce qu'on appelle le « blanc du solvant »).

On ajoute ensuite dans la cellule de mesure une masse de m mg d'eau mesurée soit avec l'aide d'une microsiringue du type utilisé en chromatographie (au 1/10 de microlitre), soit sous forme d'une masse précise d'un hydrate solide de composition connue : acide oxalique à 2 H_2O (28,57 % en eau), ou tartrate de sodium à 2 H_2O (15,66 % en eau). Soit V_3 le nouveau volume (en mL) de réactif nécessaire, pour retrouver le point d'équivalence. Le titre T du réactif (son équivalent en eau, normalement de l'ordre de 5 mg/mL) est donné par la relation 20.4 :

$$T = \frac{m}{V_3} \quad (20.4)$$

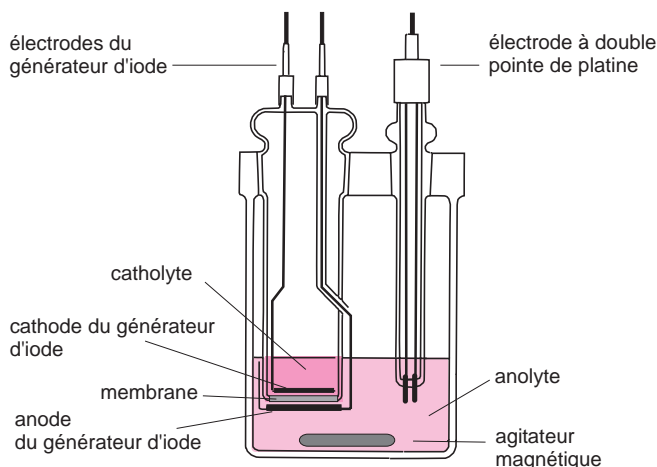


Figure 20.14 Cellule du coulomètre Karl Fischer modèle DL-37 (reproduit avec l'autorisation de la Société Mettler Toledo).

Le diaphragme a pour but d'éviter que l'iode oxyde les ions réduits apparus à la surface de la cathode.

► Par dosage en retour

On commence par introduire une quantité suffisante de réactif pour couvrir les électrodes de détection de la cellule (cette quantité d'environ 20 mL dépend de la conception de la cellule). On ajoute ensuite du méthanol solvant, jusqu'au point d'équivalence. Après cette première phase de déshydratation, dite de prétitrage, on dispose d'un milieu parfaitement anhydre dans la cellule, pour poursuivre les autres étapes :

- on ajoute dans la cellule un volume V_2 de réactif de KF que l'on neutralise avec un volume V_1 de méthanol solvant.
- on introduit une masse précise de m mg d'eau comme pour le dosage direct et on ajoute un volume V_3 de réactif de KF excédentaire de 2 ou 3 mL à la quantité nécessaire.
- l'excès de réactif est neutralisé par un volume V_4 de méthanol solvant.

Le titre T (exprimé en mg/mL) est de :

$$T = \frac{m}{V_3 - \frac{V_2}{V_1} V_4} \quad (20.5)$$

■ Le titre du réactif de KF évolue au cours du temps par manque de stabilité des solutions. C'est pourquoi les fabricants commercialisent généralement ce réactif dans deux flacons distincts : l'un contient un mélange de dioxyde de soufre, de méthanol et de base, l'autre l'iode, ou une solution iodée. L'utilisateur mélange les contenus des deux flacons quelques jours avant emploi.

20.11.2 Détermination de la teneur en eau d'un échantillon

► Par dosage direct

On ajoute à la solution anhydre contenue dans la cellule, P mg de l'échantillon, soit tel quel, soit en solution dans un volume V_5 du même solvant. S'il faut un volume V_6 de réactif de KF pour atteindre le point d'équivalence, la masse d'eau p contenue dans la prise d'essai est égale à :

$$p = T \cdot \left(V_6 - \frac{V_2}{V_1} V_5 \right) \quad (20.6)$$

Mais si l'échantillon a été introduit sans solvant ($V_5 = 0$), la quantité d'eau dans l'échantillon sera donnée par la formule simplifiée :

$$p = T \cdot V_6 \quad (20.7)$$

► Par dosage en retour

On introduit P mg de l'échantillon dans le récipient de titrage et on ajoute le volume V_7 (*mesuré*) de réactif de KF correspondant à un excès. Enfin on dose cet excès comme ci-dessus avec un volume V_8 de méthanol.

À partir de ces valeurs la masse d'eau p dans les P mg de prise d'essai est :

$$p = T \cdot \left(V_7 - \frac{V_2}{V_1} V_8 \right) \quad (20.8)$$

Enfin, la teneur en eau (exprimée en pourcentage) est donnée par la relation :

$$\text{H}_2\text{O} \% = 100 \times \frac{p}{P} \quad (20.9)$$

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.cox-instrument.com
www.pineinst.com

www.metrohm.ch
www.radiometer.tm.fr

www.gamry.com

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 20.1

On considère, en polarographie, une solution aqueuse de nitrate de Zn ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) de concentration égale à 10^{-3} M dans KCl 0,1 M utilisé comme électrolyte support.

Calculer le rapport des deux intensités de migration et de diffusion pour l'ion Zn^{++} à proximité de la cathode.

Données : mobilités ioniques ($m^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) : Zn^{++} , $5,5 \times 10^{-8}$; NO_3^- , $7,4 \times 10^{-8}$; K^+ , $7,6 \times 10^{-8}$; Cl^- , $7,9 \times 10^{-8}$.

Exercice 20.2

Une électrode à goutte de mercure est réglée de telle sorte qu'une goutte tombe toutes les 4 s ($t = 4\text{s}$). La masse de mercure correspondant à 20 gouttes est de 0,16 g. Calculer le débit massique moyen de mercure en mg/s.

En admettant que ce débit est proportionnel à la hauteur de mercure dans le réservoir, que deviendrait la durée de vie des gouttes si la hauteur de mercure est multipliée par 3 ?

Exercice 20.3

Calculer la moyenne du courant de diffusion i_D pour l'ion Pb^{++} à la concentration de 1×10^{-3} M dans KCl 0,1M aqueux à 0°C .

Données : $m = 2 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1}$; $t = 4\text{s}$; $D = 8,67 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Exercice 20.4

1. Un échantillon de 25 mL dont la concentration en Zn^{++} est d'environ 2×10^{-8} M conduit par électrolyse à un courant de 1,5 nA.

a) Calculer le temps nécessaire pour déposer 3 % du zinc présent.

b) Montrer que la technique par stripping est plus sensible.

2. Trouver le pourcentage d'appauvrissement d'une solution de 20 mL de nitrate de zinc, 1×10^{-3} M en ce réactif au cours d'un dosage par polarographie d'une durée de 5 minutes. L'intensité dans le circuit est de 15 μA .

Exercice 20.5

On veut doser la quantité d'eau dans un lait en poudre par la méthode de Karl Fischer. Le réactif est préalablement étalonné comme suit :

On introduit dans la cellule de mesure 15 mL de solvant constitué de méthanol et de formamide. On ajoute 3 mL de réactif de KF pour atteindre le point d'équivalence.

On introduit alors 205 mg de dihydrate de l'acide oxalique. On doit ajouter 13 mL de réactif de KF pour atteindre à nouveau le point d'équivalence. On introduit enfin 1,05 g de lait en poudre dissous dans 10 mL du même solvant. On doit ajouter 12 mL de réactif de KF pour revenir au point d'équivalence.

Calculer le % massique en eau de la poudre de lait.

Exercice 20.6

Calculer la concentration massique en eau d'un lot d'éther « anhydre » sachant qu'il faut 1 coulomb pour atteindre le point d'équivalence dans un dosage de Karl Fischer (version coulométrique) réalisé à partir de 1 mL d'éther. On rappelle qu'il faut deux atomes d'iode par molécule d'eau et que la densité de l'éther est de 0,78 g/mL.

Exercice 20.7

Pour doser le fer ferreux présent dans une solution aqueuse par coulométrie ampérostatique, il est préférable d'ajouter un peu d'un sel de cérium (Ce^{+++}). On rappelle que le cation Ce^{+++} s'oxyde à un potentiel plus faible que celui de l'eau et qu'il est plus oxydant que le Fe^{++} . Écrire les réactions concernées.

Chapitre 21

Traitement des échantillons

Pour toute analyse chimique, l'analyte, qui désigne l'espèce à doser, doit être en quantité suffisante et sous une forme qui conviennent à l'instrument utilisé. La plupart des échantillons nécessitent donc un d'un pré-traitement spécifique. Cette étape, qui fait suite à l'échantillonnage proprement dit, est consommatrice de temps. Elle conditionne le résultat, au même titre que la mesure elle-même ou la précision de l'instrument utilisé. Sachant que la moitié des analyses tombent dans la catégorie des analyses de traces (moins de 1 ppm d'analyte dans l'échantillon brut), il faut des méthodes d'enrichissement importantes. Suivant les appareils et les méthodes on fait appel à diverses techniques d'extraction. C'est un domaine activement étudié qui bénéficie des acquis récents de la chimie et de la robotisation. Le grand nombre d'analyses sur de très petits échantillons, a favorisé l'apparition de procédés nouveaux visant à raccourcir les temps de préparation. Ce chapitre est, pour une large part, consacré aux traitements réservés aux échantillons destinés aux analyses chromatographiques.

21.1 LA NÉCESSITÉ D'UN TRAITEMENT PRÉALABLE

La mise en œuvre d'une analyse impose de disposer d'un échantillon. Celui-ci contient généralement les espèces recherchées, encore appelées *analytes*, (terme anglais) et le reste des composés, en nombre variable, qui constituent dans leur ensemble ce qu'on appelle la matrice. Quand il s'agit de doser des traces parmi d'autres composés des milliers de fois plus abondants, on peut toujours craindre que les résultats soient influencés par la composition de la matrice. Ce type d'interférences entre analytes et autres composés rend nécessaire de procéder à un pré-traitement de l'échantillon. Ce travail supplémentaire sur l'échantillon étant consommateur de temps (fig. 21.1), on a cherché à faciliter, à automatiser, les méthodes traditionnelles d'adsorption, d'extraction ou de précipitation.

- Le dosage par absorption atomique, à l'échelle du mg /L, de quelques éléments dans les eaux de consommation ou l'enregistrement d'un spectre infrarouge à partir d'un produit organique pur, souvent effectués en laboratoire d'enseignement, correspondent à des situations idéalement simples dans la mesure où l'échantillon ne nécessite pas de pré-traitement. Il en va autrement de la plupart des échantillons courants.

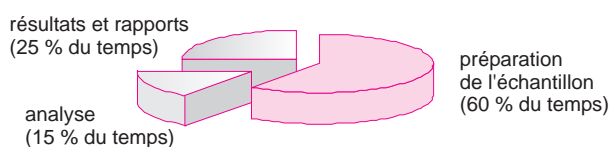


Figure 21.1 Statistique faisant état de la répartition moyenne du temps passé pour faire une analyse par chromatographie.

La préparation des échantillons représente généralement une fraction importante du temps total consacré à l'analyse.

21.2 EXTRACTION EN PHASE SOLIDE (SPE)

L'extraction sur phase solide est utilisée couramment pour *purifier* ou *concentrer* un extrait brut préalablement au dosage d'un ou plusieurs de ses constituants. Ce procédé remplace avantageusement de plus en plus souvent la méthode d'extraction liquide/liquide que l'on fait en utilisant une ampoule à décanter, un procédé comparativement moins rapide et plus coûteux.

À cette fin on utilise une petite cartouche ouverte en matière plastique, ressemblant à un corps de seringue, contenant un adsorbant solide approprié (par ex. une cartouche de 100 à 300 mg d'une phase type RP18) sur lequel on fait passer un volume connu de l'extrait brut (fig. 21.2). Il existe deux modes d'utilisation :

- Le mode le plus courant consiste dans un premier temps à retenir sur l'adsorbant les composés d'intérêt pour l'analyse projetée et à éliminer de la matrice initiale, par rinçage, le plus possible de constituants jugés indésirables pour la suite du dosage. Dans un second temps on récupère par élution les analytes avec un faible volume de solvant. On a ainsi reconstitué une solution fortement enrichie en analytes, une nécessité pour les analyses de traces.
- L'autre mode, moins fréquent, bien que très simple, consiste à faire passer l'échantillon sur le remplissage pour retenir les composés non-désirés tandis que les analytes passent librement. Dans ce cas ils sont purifiés mais non concentrés.

La nature des adsorbants est proche de celle des phases solides de la chromatographie liquide. On trouve des gels de silice greffés (polarité de phase inversée), avec une granulométrie de 40 à 100 μm pour permettre une percolation d'un débit plus rapide. D'autres adsorbants à base de carbone graphité ou de copolymères styrène-divinylbenzène à grande surface spécifique, porteurs de groupements fonctionnels, sont plus stables pour les solutions à pH très acides. On trouve également des disques d'extraction (0,5 mm d'épaisseur et 25 à 90 mm de diamètre) utilisés comme l'est un papier filtre sur une fiole à vide, destinés à retenir les traces de composés organiques présents dans des volumes importants de solutions aqueuses, ce qui n'est guère possible avec les cartouches décrites ci-dessus. Il y a dans ce cas une concentration (le facteur d'enrichissement peut atteindre 100, ce qui facilite l'analyse en augmentant les limites de détection).

Les utilisations types sont les suivantes : on isole les composés non polaires d'une matrice polaire avec une cartouche ou un disque de gel de silice greffé C-18 ou on isole les composés polaires d'une matrice non polaire avec une cartouche remplie d'une phase normale ou enfin on isole les composés chargés sur une phase échangeuse d'ions. Ces trois exemples sont adaptés respectivement aux analyses par CLHP en polarité de phase inversée, normale et ionique.

Cette sorte de filtre chimique est utilisable une seule fois.

Le procédé peut être automatisé. Il convient généralement mieux pour les composés hydrophobes ou apolaires que pour les substances ioniques.

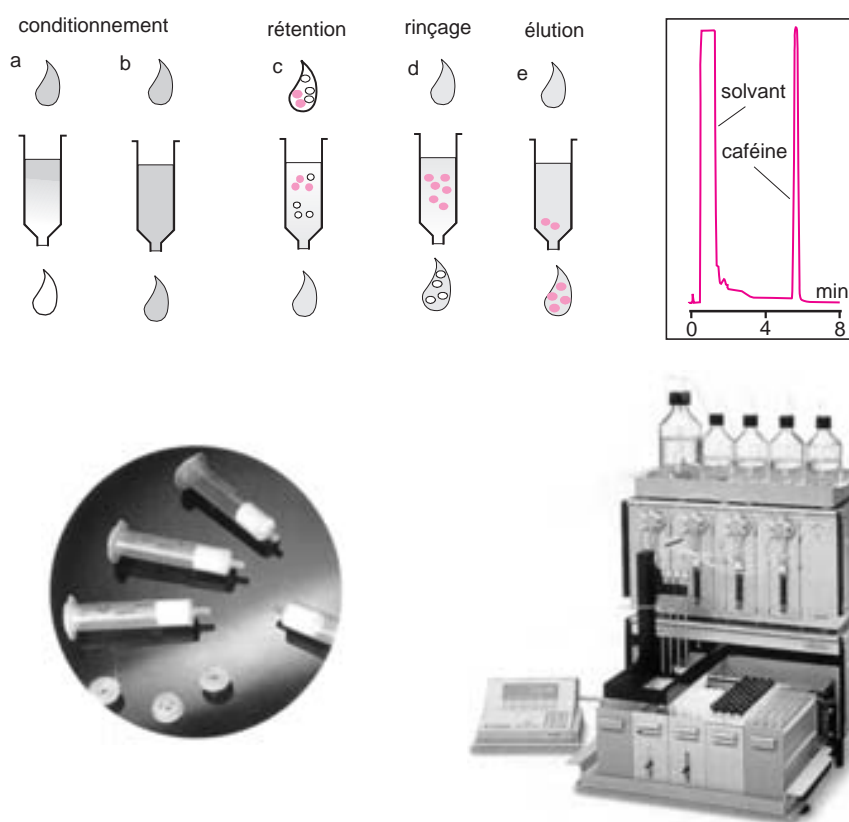


Figure 21.2 Extraction en phase solide.

Séparation d'un analyte de la matrice. Dans cet exemple l'analyte est le seul composé retenu. On distingue les étapes : a), b) activation et rinçage de l'adsorbant avant emploi ; c) dépôt d'un volume donné de l'échantillon ; d) élimination des interférences ; e) récupération de l'analyte par percolation. À droite, chromatogramme (CPG) obtenu après traitement par cette séquence d'1 mL de café. En bas, cartouches d'extraction en phase solide (SPE) ; on notera qu'elles ont une partie réservoir de 1 à 3 mL. À droite, préparateur d'échantillons (modèle Aspec XL4 reproduit avec l'autorisation de la société Gilson).

■ Deux points particuliers méritent attention : dans l'étape d'extraction il ne faut pas atteindre le volume de relargage (volume de percée), au-delà duquel une partie du composé à extraire n'est plus piégée par la cartouche. D'autre part dans l'étape de percolation, le rendement de la récupération du composé adsorbé est rarement total. Si la méthode de dosage fait appel à une détection par spectrométrie de masse, on peut résoudre ce problème de quantification en ajoutant à un volume donné de l'échantillon avant extraction une quantité connue de ce même composé marqué à l'aide d'un isotope stable. Le comportement dans l'extraction des deux formes du composé étant le même, la comparaison de leurs signaux respectifs permet d'établir le rapport de leurs concentrations donc de connaître finalement la concentration cherchée. On a l'équivalent d'une méthode d'étalonnage interne avec un étalon dont le coefficient de réponse relatif serait de 1 (*cf.* § 4.9).

Un axe de recherche actuel consiste à préparer des adsorbants ayant une affinité marquée pour un type de composé particulier. Pour cela on synthétise des polymères qui possèdent des sites de reconnaissance sous forme de déformations de la surface, aptes à piéger des molécules cibles. Le principe retenu rappelle celui de l'immuno-extraction, encore plus sélectif, expliqué ci-après.

■ En extraction liquide-liquide conventionnelle, il y a dilution de l'analyte dans une grande quantité de solvant. Par conséquent lorsqu'on concentre la solution d'extraction, on concentre nécessairement les impuretés non volatiles contenues dans le solvant, ce qui rend bien souvent la méthode inacceptable si on ne dispose pas de solvants ultra-purs. Si 1 mg d'un analyte se trouve, par exemple, mélangé avec 1 mL de solvant pur à 99,9 %, ce dernier apporte une masse de produits annexes égale à celle de l'analyte.

21.3 CARTOUCHES D'IMMUNO-EXTRACTION

Avec les cartouches classiques d'extraction en phase solide, la rétention des analytes est basée sur les interactions hydrophobes. Elle peut manquer de sélectivité si la matrice dans laquelle se trouve l'analyte à l'état de trace contient des composés interférants dont la concentration est beaucoup plus grande. Le résultat risquant d'être faussé, il a été développé des matériaux d'extraction aptes à isoler le seul analyte. Cette reconnaissance moléculaire est basée sur les interactions du type antigène / anticorps (*cf.* § 17.6).

En fixant, par liaison covalente un composé appelé anticorps sur un support solide adapté, on modifie sa structure en surface qui retient alors sélectivement l'antigène correspondant (fig. 21.3). Ce principe adopté depuis longtemps dans le domaine médical trouve des applications pour les petites molécules organiques. Ainsi il existe des cartouches d'extraction contenant des anticorps baptisés anti-atrazine, anti-simazine, ou anti-isoproturon (familles des triazines et des phénylurées). Elles sont adaptées à la recherche des herbicides portant les mêmes noms.

Comme il a été signalé dans le paragraphe précédent, le rendement de l'extraction n'est jamais de 100%. Il peut s'agir pour l'immuno-extraction d'un nombre insuffisant de sites actifs. On doit donc prendre la précaution d'ajouter une quantité connue d'un traceur.

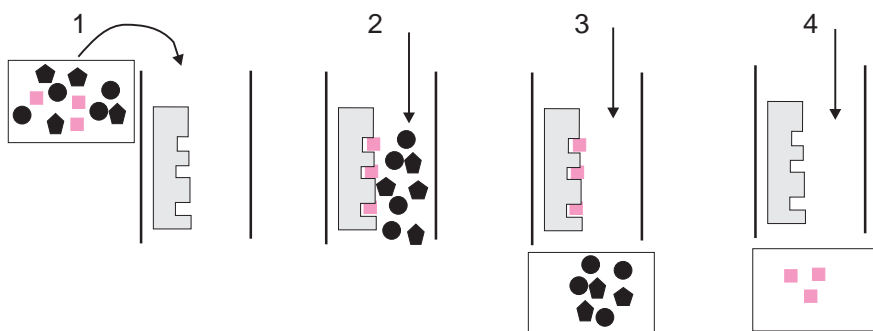


Figure 21.3 Principe de l'immuno-extraction.

Les différentes étapes du procédé classique sur un support greffé avec un anticorps adapté aux molécules « carrées ». Après l'étape de fixation (2), puis de rinçage (3), l'élution de l'analyte est faite avec un solvant organique (étape 4).

21.4 PROCÉDÉS DE MICRO EXTRACTION

21.4.1 Micro extraction en phase solide (SPME de la société Supelco)

Le dispositif mis au point par la Société Supelco comporte une seringue particulière dans laquelle une courte fibre, fixée à l'extrémité du piston, peut sortir par l'aiguille ou y être rétractée. Cette fibre en silice poreuse, recouverte d'un adsorbant polymérique ou d'un gel de silice de type C-18, est introduite pendant plusieurs minutes dans la phase aqueuse à analyser (fig. 21.4a) ou dans l'espace situé au-dessus de sa surface (« espace de tête, cf. § 21.6). Ainsi exposée, elle se charge des composés extractibles de la matrice. Elle est ensuite insérée dans l'injecteur d'un chromatographe, où, par effet de la température (analyse par CPG) ou d'un solvant (analyse par CLHP), les analytes sont désorbés, puis séparés. On obtient de bons résultats pour les séries homogènes d'échantillons. La même fibre peut être réutilisée une cinquantaine de fois.

21.4.2 Micro extraction en phase liquide (LLE)

La micro extraction liquide/liquide consiste à immerger l'aiguille d'une microsiringue remplie avec un solvant très pur tel l'hexane dans la solution aqueuse contenant les produits à extraire (fig. 21.4b). On fait apparaître à l'extrémité de l'aiguille une gouttelette de ce solvant qui va absorber pendant quelques minutes les composés dissous dans le milieu aqueux, puis on ré-aspire dans la seringue cette gouttelette avant de l'injecter en CPG.

- La purification de petites quantités de solutions aqueuses se passe avantageusement de la classique ampoule à décanter en la remplaçant par une petite colonne contenant un matériau poreux chimiquement inerte qui absorbe fortement l'eau. L'échantillon aqueux est tout d'abord introduit dans la colonne (dont le volume doit être tel que toute la solution soit absorbée). À ce stade l'eau diffuse dans le matériau inerte et se comporte comme un film immobile de phase aqueuse. Ceci permet de neutraliser et laver la phase aqueuse contenant les analytes par un solvant non miscible à l'eau.

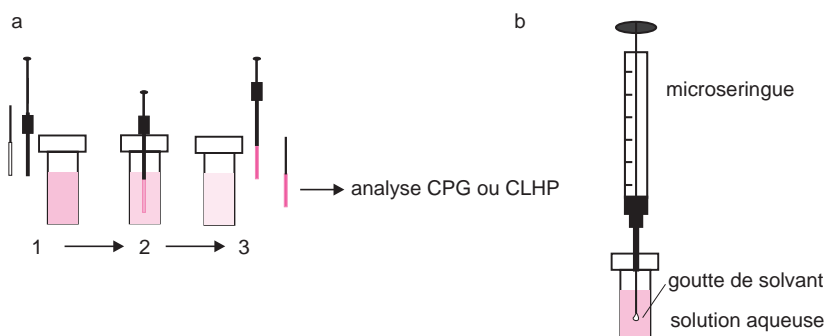


Figure 21.4 Procédés de micro extraction.

a) Micro extraction utilisant une fibre d'adsorption ; b) micro extraction avec une seule goutte de solvant organique.

21.5 EXTRACTION GAZEUSE SUR COLONNE OU SUR DISQUE

Pour doser de faibles concentrations de composés moléculaires particuliers à l'état de vapeur dans l'air (hygiène industrielle, analyses environnementales), la meilleure méthode actuelle consiste à les piéger en faisant passer un volume déterminé de l'échantillon dans un tube adsorbant ou dans une cartouche du type SPE à usage unique (fig. 21.5).

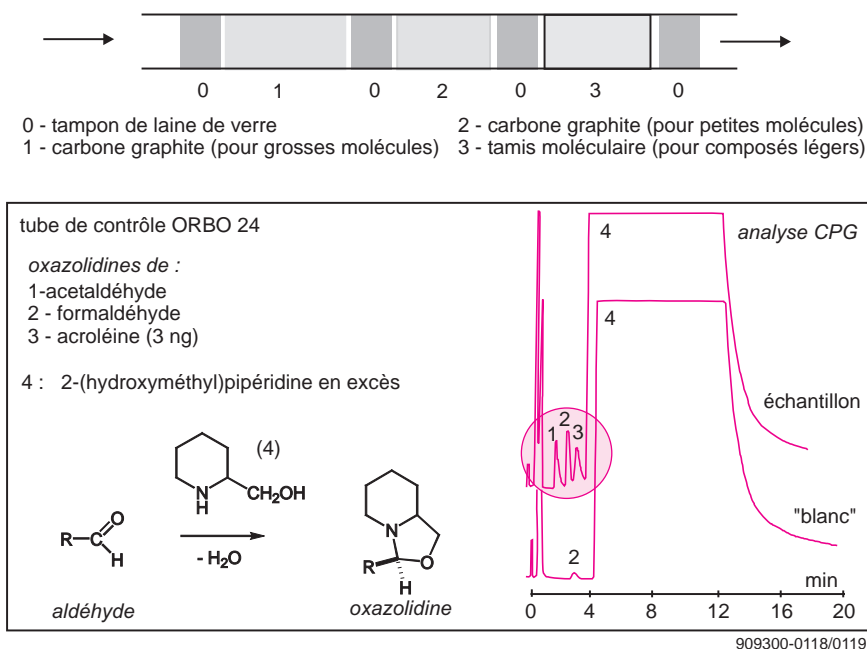


Figure 21.5 Extraction d'un gaz.

Principe d'une colonne d'extraction gaz /solide – Réaction chimique mise en jeu pour dériver un aldéhyde (test d'atmosphère polluée, document Supelco Inc.).

La composition des adsorbants est très variable : tamis moléculaire, noir de carbone à structure graphitique, polymères organiques porteurs de fonctions, un même tube pouvant contenir une succession de plusieurs adsorbants différents. Une pompe débitmétrique assure l'aspiration d'un volume gazeux préréglé en fonction de la capacité du piège (débit de 0,1 à 1 L/min).

Les composés adsorbés sont récupérés soit par extraction au moyen de solvants (assez souvent du sulfure de carbone), soit par désorption thermique par un gaz vecteur (ce qui a pour avantage de ne pas diluer les analytes).

Cette dernière technique est adaptable à l'analyse par chromatographie en phase gazeuse. Le piège est soumis, dans un four spécial, à une élévation de température pouvant atteindre 350 °C en quelques secondes. Les composés désorbés sont directement transférés dans l'injecteur du chromatographe. En alternative à ces fours, il existe des tubes d'extraction d'un diamètre suffisamment petit pour qu'il soit possible de les introduire directement dans un injecteur modifié.

La récupération des composés est considérée comme satisfaisante lorsqu'elle atteint 60 %, mais elle est souvent presque quantitative.

■ « *Purge and trap* » Un même tube d'extraction rempli avec plusieurs couches d'adsorbants permet de retenir une large gamme de composés polaires et apolaires. Chaque couche protège la suivante plus active. La première couche sert à purger l'échantillon des composés lourds. Les composés légers et les gaz sont adsorbés par les suivantes. Pour effectuer la récupération (*trap*), on inverse le circuit du gaz de balayage, si bien que les composés lourds (de poids moléculaires élevés), retenus au début du tube, s'éliminent en premier (cf. § 21.6).

Des problèmes nouveaux ont fait leur apparition avec la proportion importante des analyses de traces (plus de 50 % des échantillons traités) : adsorption sur les parois des récipients, action du dioxygène de l'air ambiant, évaporation des analytes, etc. On privilégie par conséquent les méthodes conduisant à un fort enrichissement, en conservant un temps d'extraction court.

Les mêmes principes sont appliqués pour réaliser des *tubes détecteurs* qui comportent en plus des adsorbants un réactif qui provoque un changement de couleur du contenu du tube. C'est un moyen simple sans extraction de surveillance de contaminants sans analyse. Les alcootests peuvent être rangés dans cette catégorie. Il existe enfin des badges utilisés en hygiène industrielle pour les contrôles de pollution sur les lieux de travail ou dans l'environnement. La circulation de l'air à travers le badge se fait, dans ce cas, de manière naturelle et non forcée. La flexibilité de la méthode est due au grand choix de phases adsorbantes qui permettent des sélectivités d'extraction. Il peut s'avérer nécessaire de stabiliser certaines molécules qui pourraient se décomposer au niveau de l'adsorbant, en les transformant sous forme d'un dérivé spécifique par un réactif mélangé à l'adsorbant.

21.6 ESPACE DE TÊTE (HEADSPACE)

L'*espace de tête* est un dispositif d'extraction, fonctionnant en tandem avec une installation de CPG (fig. 21.6), et réservé à l'analyse des composés volatils présents dans une matrice non chromatographiable. Le principe est illustré par les deux variantes :

- le *mode statique* : l'échantillon (matrice liquide ou solide) remplit incomplètement un petit récipient de verre fermé par un bouchon transperçable. Après une période d'équilibre thermodynamique entre les phases en présence (1/2 à 1 h), on prélève un peu de la vapeur en équilibre. Dans ces conditions, la quantité de chaque composé volatil dans le volume d'espace de tête est proportionnel à sa concentration dans la matrice. Après étalonnage (méthode du standard interne ou externe), il est possible de faire correspondre les concentrations réelles dans l'échantillon avec celles des vapeurs injectées dans le chromatographe.
- *mode dynamique* : on opère dans un récipient spécial ouvert, appelé échantillonneur, contenant la phase aqueuse à extraire. On fait barboter un gaz vecteur, tel l'hélium, dans cette solution pour entraîner les parties volatiles vers un piège « *purge and trap* » décrit précédemment où elles sont adsorbées et concentrées (fig. 21.7). Puis on procède à une désorption thermique du piège à contre-courant en vue de l'injection dans le chromatographe. Cette technique est semi-quantitative.



Figure 21.6 Espace de tête, modèle dynamique associé avec un chromatographe en phase gazeuse. Les flacons échantillons sont pressurisé avec le gaz vecteur du chromatographe. Le système « *purge and trap* » combine la préparation (simple) de l'échantillon, sa désorption et son introduction dans la colonne du chromatographe (modèle EA600 reproduit avec l'autorisation de la société CDS Analytical).

■ Lorsque l'analyse est répétitive sur des matrices très figées, cette méthode est tout à fait fiable. Mais si la matrice est fluctuante, elle perturbe les facteurs d'équilibre et la précision devient mauvaise par suite d'un étalonnage non conforme. Dans ce cas on préférera l'extraction sur cartouche.

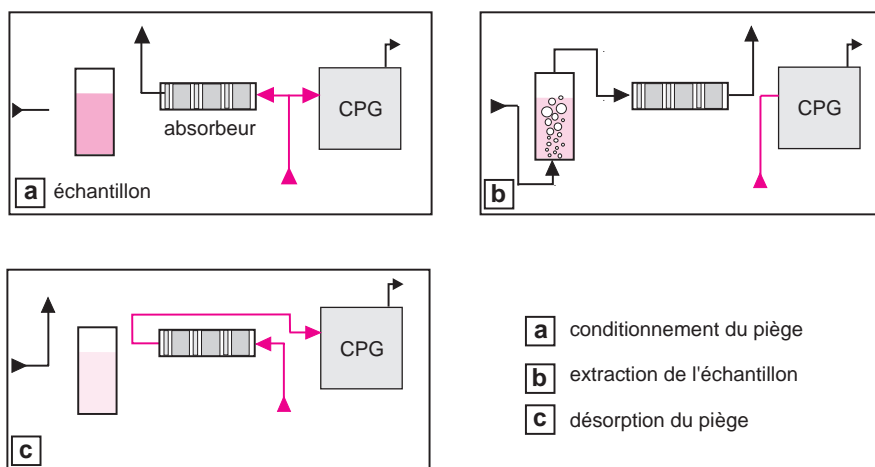


Figure 21.7 Espace de tête, modèle dynamique.

L'échantillon est récupéré par désorption thermique (« *stripper* ») d'une cartouche « *purge and trap* » choisie en fonction du composé à extraire.

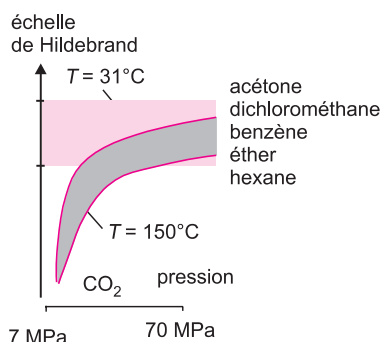
21.7 EXTRACTION PAR SOLVANT À L'ÉTAT SUPERCRITIQUE

L'extraction par un fluide à l'état supercritique (CO_2 , N_2O ou CHClF_2 – Fréon22), est un procédé efficace connu depuis longtemps dans l'industrie alimentaire (cf. § 6.1). Les extracteurs pour analyse fonctionnent sur le même principe. Ils comportent un récipient tubulaire très résistant, dans lequel on place échantillon (solide ou semi-solide) et fluide à l'état supercritique. On distingue deux modes d'utilisation :

- le mode *off-line* pour lequel on dépressurise le fluide supercritique après extraction. En retournant à l'état gazeux, il abandonne les analytes sous forme concentrée, ainsi que d'éventuelles impuretés indésirables sur la paroi du récipient d'extraction. On poursuit le traitement par extraction sélective avec des solvants classiques ou sur cartouche en phase solide pour conjuguer extraction et sélectivité.
- le mode *on-line* qui consiste à faire une analyse directe de l'extract, toujours maintenu sous pression, en le faisant passer dans une installation de chromatographie (SFC ou CLHP). Ce procédé ne s'applique qu'aux composés pour lesquels on ne craint pas des interférences dues à l'entraînement d'une partie de la matrice.

La méthode permet de moduler quatre paramètres qui agissent sur la sélectivité : la pression, la température, la durée d'extraction et le choix des modifiants. Il est possible d'agir sur le caractère de solvation du fluide en introduisant des modificateurs organiques (méthanol, acétone), la polarité du gaz carbonique seul, à l'état supercritique, étant comparable à celle de l'hexane (pour 100 atm. et 35 °C). Cependant, séparer l'analyte de la matrice exige des connaissances sur la solubilité et la vitesse de transfert du soluté dans le solvant et sur les interactions physiques et chimiques entre matrice et solvant (fig. 21.8).

- L'emploi des micro-ondes en association avec une extraction par un solvant classique, en récipient clos sous pression, est un autre procédé très efficace qui permet un traitement rapide des échantillons, et qui peut se substituer aux fluides supercritiques.



caractéristiques des gaz employés
comme fluides supercritiques

fluide	point critique (T °C)	moment dipolaire (Debye)
CO ₂	32	0
N ₂ O	37	0,2
CHClF ₂	96	1,4



Figure 21.8 Extraction par fluide supercritique.

Comparaison des forces d'élution du CO₂ par rapport aux solvants usuels (échelle de Hildebrand) en fonction de la température et de la pression. L'extraction en phase supercritique est une méthode automatisable qui devient un investissement rentable dès lors que le nombre d'échantillons est important. Extracteur d'échantillons par fluides supercritiques (modèle SFE-703 reproduit avec l'autorisation de la société Dionex).

21.8 RÉACTEURS À DIGESTION PAR MICRO-ONDES

La décomposition des échantillons inorganiques ou comportant des matières organiques a donné lieu à beaucoup d'approches : traitement par les acides minéraux, combustion, usage de fondants. La minéralisation se fait par des procédés par voie sèche (four) et d'autres par voie humide (traitement avec des acides). En l'absence de méthode universelle applicable à tous les éléments minéraux, il faut adapter la minéralisation à l'échantillon. Cette étape indispensable de préparation de très nombreux échantillons, en particulier pour l'absorption et l'émission atomiques, est facilitée par l'emploi d'un « digesteur à micro-ondes ».

- La manipulation classique en récipients ouverts, sous une hotte, dans une atmosphère de vapeurs acides, avec un risque de contamination croisée omniprésent, est une opération longue et fastidieuse qui n'a pas fondamentalement changé depuis un siècle. Au-delà des problèmes pratiques, certaines matrices d'échantillons s'avèrent rigoureusement impossibles à traiter sous ces conditions (matériaux réfractaires ou volatils, certains minerais, charbons, huiles lourdes).

Les digesteurs à micro-ondes comportent un autoclave de quelques mL en téflon dans lequel on place l'échantillon brut et la solution d'attaque (nécessaire à la carbonisation ou à l'oxydation). Le chauffage, provoqué par micro-ondes, se fait par le biais de l'agitation moléculaire due aux dipôles des molécules d'eau. Le récipient clos, de type calorimétrique, évite les pertes par projections ou évaporation des combinaisons volatiles. Les températures atteintes par les solutions acides sous pression dépassent rapidement les températures d'ébullition en conditions normales (effet d'une marmite sous pression), si bien qu'on enregistre des gains de temps pouvant dépasser, dans certains cas, plus de 90 %. On peut ainsi procéder à des digestions sulfuriques ou perchloriques, faire des hydrolyses ou des minéralisations de Kjeldahl en milieu oxydant. Ce système permet l'automatisation en toute sécurité.

21.9 ANALYSEURS EN LIGNE

Pratiquement toutes les méthodes instrumentales de laboratoire ont été adaptées en analyse de procédés sur site, des mesures de pH aux analyses par RMN (fig. 21.9). Les appareils sont généralement moins versatiles que leurs homologues de laboratoire. Dédiés à des mesures particulières et prévus pour travailler dans un environnement plus hostile, ils doivent être robustes. L'emploi d'un capteur sélectif immergé au sein du produit à analyser n'est pas toujours possible. On doit alors en dévier une petite fraction afin de lui faire subir le traitement adéquat.

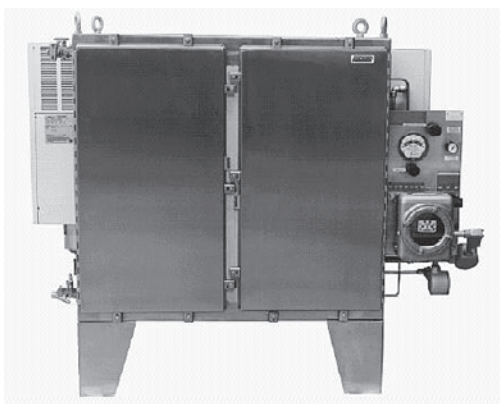


Figure 21.9 Analyseur de procédé par RMN.

L'appareil mesure, en temps réel, les propriétés spectrales des composés liquides circulant dans une installation de raffinerie (reproduit avec l'autorisation de la société Foxboro).

Une catégorie particulière d'analyse est celle où l'extraction / préparation de l'échantillon est intégrée « en ligne » dans la chaîne analytique. On lui fait subir une succession de réactions chimiques ou physico-chimiques avant la mesure sans que cela constitue une étape distincte. Le résultat doit être obtenu rapidement afin qu'il soit repris par le système d'asservissement pour optimiser ou assurer la stabilité de l'opération ainsi régulée. L'analyseur en ligne permet de contrôler le procédé soit en aval soit en amont (fig. 21.10).

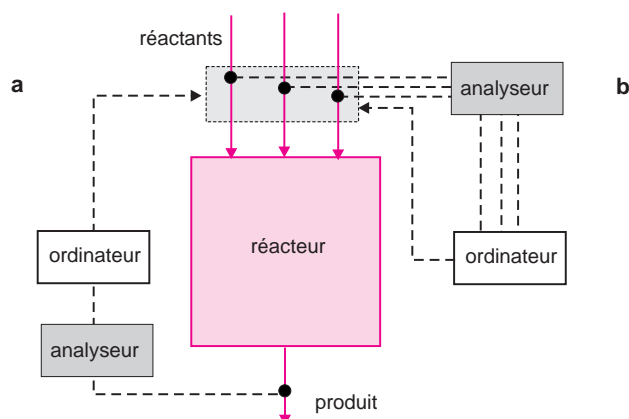


Figure 21.10 Les deux procédés de contrôle par analyseur « on line ».

Sur l'exemple d'une réaction chimique, le procédé a correspond à un contrôle aval, après synthèse (contrôle en boucle fermée par comparaison avec une valeur de consigne). En revanche, le procédé b correspond à un asservissement amont (en boucle ouverte, par ajustement continu de la composition des réactants).

QUELQUES SITES SUR INTERNET

www.sigmaaldrich.com
www.midac.com
www.abb.com

www.dionex.com
www.modcon-systems.com

www.gilson.com
www.thermoquest.com

Chapitre 22

Paramètres statistiques de base

En analyse chimique comme dans beaucoup d'autres sciences, les méthodes statistiques sont incontournables. Le tracé de chaque droite d'étalonnage en constitue une application de tous les jours, de même qu'un résultat d'analyse n'a de valeur que s'il est assorti d'une estimation de l'erreur possible. Dès qu'une mesure est répétée, une exploitation statistique s'impose, mais les lois d'échantillonnages et les tests d'hypothèses doivent être maîtrisés pour éviter toute conclusion sans valeur, ou bien permettre la mise en place de l'assurance qualité. Les erreurs systématiques (personnelles, instrumentales...) ou les erreurs grossières qui conduisent heureusement à des résultats hors limite ne rentrent pas dans ce domaine. Seules les erreurs indéterminées sont prises en considération avec les tests les plus courants rencontrés en chimie.

22.1 VALEUR CENTRALE, JUSTESSE ET FIDÉLITÉ D'UN ENSEMBLE DE MESURES

Quand on répète une mesure faite sur un même échantillon (au sens chimique du terme), on obtient, d'autant plus fréquemment que ces mesures se veulent précises, des valeurs individuelles légèrement différentes. Dans ce cas on estime que pour calculer le résultat final il est préférable de se baser sur la moyenne arithmétique de ces n mesures, désignée par la *valeur centrale* \bar{x} , ou *moyenne*, plutôt que sur une des mesures individuelles prise au hasard :

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (22.1)$$

■ Une alternative à la moyenne ou valeur centrale, plus rarement utilisée en analyse chimique, consiste à prendre la médiane : après avoir classé les valeurs expérimentales par ordre croissant, on extrait celle qui est située au milieu de la série, sauf si le nombre de valeurs est pair auquel cas on prend la moyenne des deux valeurs situées au centre. La médiane a l'avantage de ne donner aucun poids particulier à une valeur aberrante. Par exemple si les valeurs sont 12,01 ; 12,03 ; 12,05 ; 12,68, la moyenne arithmétique est 12,19 et la médiane 12,04, une valeur certainement meilleure que la moyenne arithmétique, car elle ne tient pas compte de la dernière valeur qui apparaît anormale dans l'exemple choisi (dispersion de 0,67). La médiane fait partie d'un autre type de statistiques (méthodes non-paramétriques, § 22.8).

La valeur centrale, de même que les mesures sont des variables aléatoires, puisque impossibles à connaître par avance.

Cependant ce n'est pas parce qu'en répétant une mesure un grand nombre de fois, on trouve des valeurs peu différentes entre elles, que la valeur centrale est proche de la valeur exacte, désignée par la *valeur vraie* x_0 , (que l'on ne connaît pas) par suite de l'existence possible d'erreurs systématiques.

On considère que chaque mesure x représente la somme de la valeur vraie x_0 et d'une *erreur expérimentale absolue* ε . L'erreur absolue ε_i sur la mesure i est donc exprimée par :

$$\varepsilon_i = x_i - x_0 \quad (22.2)$$

Si n devient très grand (cas d'une population statistique), la valeur centrale \bar{x} devient la *moyenne vraie*, m , qui se confondra avec la valeur vraie x_0 en l'absence d'erreurs systématiques et à condition que les mesures suivent la loi dite Normale, encore appelée distribution de Gauss (fig. 22.2).

Si la valeur vraie x_0 est connue (analyse effectuée, par exemple, sur un étalon de composition parfaitement définie), on caractérise la *justesse* (ou *exactitude*) du résultat ou de la méthode utilisée par l'*erreur totale* ε calculée comme suit à partir de la moyenne vraie (cf. tableau 22.1).

$$\varepsilon = m - x_0 \quad (22.3)$$

L'*erreur relative* E_R sur une mesure (ou sur la valeur centrale) correspond au quotient de la valeur absolue de l'écart correspondant $|\varepsilon_i|$ (ou $|\varepsilon|$), par la valeur vraie. E_R peut s'exprimer en % ou en ppm.

$$E_R = \frac{|x - x_0|}{x_0} \quad (x \text{ pour } x_i \text{ ou } \bar{x}) \quad (22.4)$$

Si on ne connaît pas x_0 , ce qui est en général le cas en analyse chimique, on calcule l'*erreur expérimentale* de la mesure i , soit e_i , en remplaçant dans 22.2, x_0 par la moyenne \bar{x} :

$$e_i = x_i - \bar{x} \quad (22.5)$$

e_i représente l'écart algébrique entre la moyenne et la i^e mesure. L'erreur expérimentale moyenne \bar{d} , ou moyenne des écarts, calculée sur les n mesures, permet d'apprécier la *fidélité* :

$$\bar{d} = \frac{\sum |x_i - \bar{x}|}{n} \quad (22.6)$$

Dans cette dernière relation on fait intervenir les valeurs absolues des erreurs expérimentales, sinon \bar{d} tendrait rapidement vers 0 avec n .

22.2 VARIANCE ET ÉCART-TYPE

La moyenne des écarts a cependant pour inconvénient qu'elle n'est pas interprétable statistiquement, car les grandes et petites déviations individuelles, qui ne sont pas également probables, ont le même poids. Aussi choisit-on plutôt de sommer les carrés des différences.

On aboutit ainsi à la définition la plus employée de la *précision@précision* (reproductibilité) en statistique, repérée par la *variance* s^2 , dont l'estimation vaut, pour n mesures :

$$s^2 = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

(22.7)

La racine carrée de la variance est l'*écart-type* (aussi appelé *écart quadratique* ou *dévi-
ation standard* par transcription littérale du terme anglo-saxon qui lui correspond, mais qu'il faut éviter). Il est désigné par s lorsqu'on est en présence d'un petit nombre n de mesures et par σ lorsqu'il s'agit d'une population statistique de valeurs. L'écart-type s , « indicateur de dispersion », est donc exprimé avec les unités de x .

Les calculettes et les tableurs disposent des fonctions correspondantes (pour un nombre « infini » de mesures, s est noté σ , et n remplace $n - 1$).

$$s = \sqrt{s^2} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

(22.8)

Tableau 22.1 Exemple de résultats d'une analyse regroupant les différents paramètres des § 22.1 et 22.2 (la valeur vraie est $x_0 = 20$)

chimiste	1	2	3	4
mesure 1	20,16	19,76	20,38	20,08
mesure 2	20,22	20,28	19,58	19,96
mesure 3	20,18	20,04	19,38	20,04
mesure 4	20,2	19,6	20,1	19,94
mesure 5	20,24	20,42	19,56	20,08
moyenne arithm.	20,2	20,02	19,8	20,02
médiane	20,20	20,04	19,58	20,04
justesse ε	0,2	0,02	0,2	0,02
erreur relative E_R (expression 22.4)	0,01 ou 1 % ou 10^4 ppm	1×10^{-3} ou 0,1 % ou 1 000 ppm	0,01 ou 1 % ou 10^4 ppm	* 1×10^{-3} ou 0,1 % ou 1 000 ppm
variance (s^2)	$7,84 \times 10^{-4}$	0,1183	0,1772 *	$3,6 \times 10^{-5}$
écart-type (s)	0,028	0,344	0,421	0,006
commentaires sur le résultat	<i>précis</i> <i>non juste</i>	<i>imprécis</i> <i>juste</i>	<i>imprécis</i> <i>non juste</i>	<i>précis</i> <i>juste</i>

Pour comparer des résultats ou exprimer l'incertitude d'une méthode on présente assez souvent s de manière relative. Ainsi on calcule l'*écart-type relatif* (ou *RSD* pour *relative standard déviation*), encore appelé *coefficient de variation* (*CV*) exprimé le plus souvent en % :

$$CV = 100 \times \frac{s}{\bar{x}}$$

(22.9)

■ Quand un résultat d'analyse découle d'un calcul dans lequel interviennent plusieurs valeurs expérimentales, chacune ayant son propre écart-type, il y a propagation des erreurs. La précision du résultat est calculée à l'aide d'équations simples que l'on trouvera dans tous les ouvrages généraux sur les statistiques.

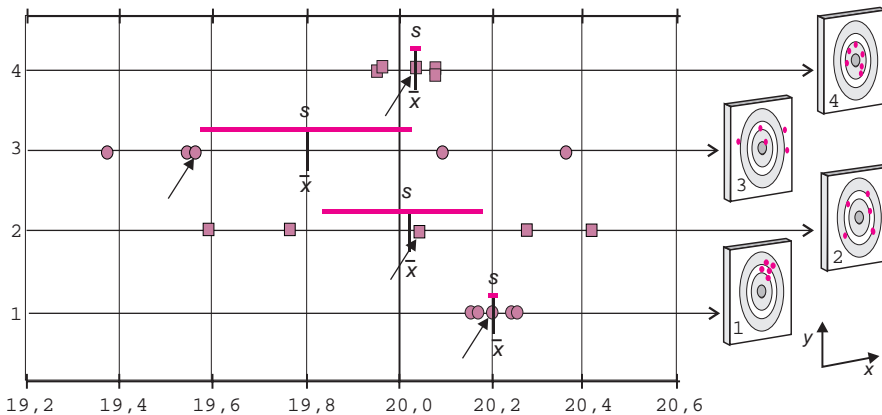


Figure 22.1 Illustration graphique des résultats du Tableau 22.1.

Pour illustrer *justesse* et *précision* ont été reportés sur le graphe les écarts-types calculés d'après la formule 22.8. On remarquera les différences entre les moyennes arithmétiques pointées sur le graphe par un petit trait vertical et les valeurs médianes correspondantes qui sont fléchées. Pour les résultats des chimistes 3 et 4, la différence est assez importante. Le chimiste 1 a commis très probablement une erreur systématique. À droite, illustration classique de la précision et de la justesse à l'aide d'une cible. Cette image est moins simple qu'il n'y paraît car il règne une incertitude en x et en y .

22.3 ERREURS ALÉATOIRES OU « INDÉTERMINÉES »

En l'absence d'erreurs systématiques, on a affaire aux erreurs accidentelles « dues au hasard » qui ne peuvent être contrôlées car indéterminées. Le sens et l'amplitude de ce type d'erreurs varient de manière non reproductible d'une mesure à l'autre. L'analyse mathématique de la *courbe d'erreur* conduit à la conclusion que la moyenne arithmétique \bar{x} des valeurs individuelles est la meilleure estimation de la moyenne vraie m (fig. 22.2). La symétrie de cette courbe et son aspect montrent que :

- il y a un nombre égal d'erreurs positives et négatives par rapport à la valeur centrale ;
- les petites erreurs sont plus nombreuses que les grandes erreurs ;
- la valeur la plus souvent rencontrée est la *valeur centrale* m (sans erreur).

La loi de distribution Normale (courbe de distribution de Gauss) est le modèle mathématique qui représente le mieux la répartition des erreurs dues au hasard (équation 22.10) :

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{(x - m)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (22.10)$$

Afin de rendre cette expression universelle, on prend pour origine des x la moyenne vraie m de la population et pour unité de mesure son écart-type σ (fig. 22.2).

Avec $X = \frac{x - m}{\sigma}$ la relation 22.10 devient

$$f(X) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp \left[-\frac{x^2}{2} \right] \quad (22.11)$$

■ Si le nombre de mesures n'est pas très grand, il est important de connaître leur distribution. La courbe obtenue informe sur la fiabilité *Re* des résultats (du terme anglais **reliability**). La fiabilité d'une moyenne en tant que moyen d'estimation de la valeur vraie croît comme la racine carrée du nombre *n* de mesures.

$$Re = K\sqrt{n} \quad (22.12)$$

C'est pourquoi, si on passe de n_1 mesures à un nombre supérieur n_2 , on améliore la fiabilité *Re* d'un facteur *k* tel que :

$$k = \sqrt{\frac{n_2}{n_1}} \quad (22.13)$$

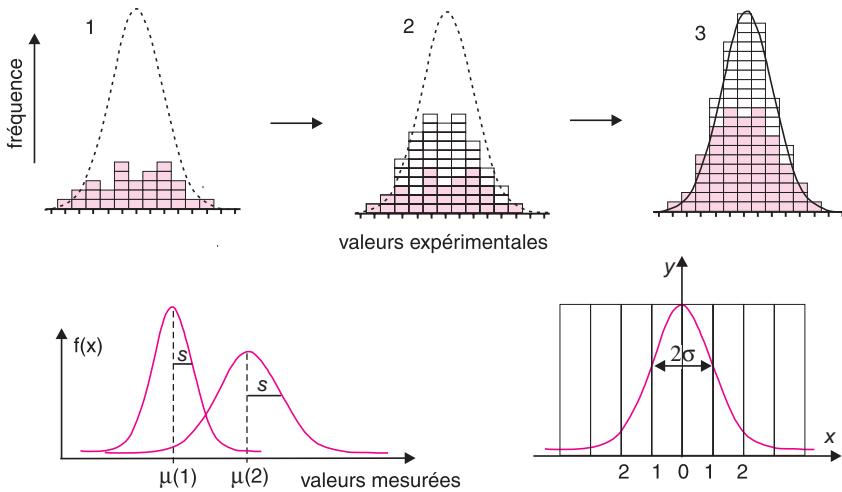


Figure 22.2 Courbes de Gauss.

Quand le nombre de mesures devient grand, et si l'intervalle de classe est étroit, le contour de cet empilement (mesure/fréquence) épouse la forme d'une courbe de Gauss (loi de distribution Normale). En bas, deux séries de résultats centrés sur deux moyennes différentes. Si le nombre de mesures est petit on ne peut pas deviner la moyenne (ou la valeur) vraie. À droite, forme réduite de la courbe de Gauss.

La fonction de répartition est l'intégrale de la fonction $f(X)$. Cette courbe est telle que 95,4 % de l'aire est comprise dans un intervalle de $\pm 2\sigma$ autour de la valeur centrale. On dit encore que les chances sont de 95,4 % pour que l'erreur d'une mesure donnée soit comprise dans un intervalle de $\pm 2\sigma$. Une valeur élevée de l'écart-type σ signifie une courbe d'erreur évasée. Si le nombre de valeurs est modeste (quelques unités), on doit prendre *s* (fig. 22.2). Plus *n* est grand, meilleure est la correspondance.

Ainsi *s* et \bar{x} sont des estimations de σ et de la moyenne vraie *m* qui se rapportent à la population totale.

■ En pratique, on ne connaît ni la moyenne vraie *m* ni l'écart-type σ puisqu'on ne dispose que d'un nombre limité *n* de valeurs. On doit se contenter de calculer *s*. D'autre part quand on dispose de beaucoup de mesures répétitives concernant un échantillon, on utilise le test χ^2 pour savoir si la distribution des fréquences (c'est-à-dire du nombre de fois où on a une valeur donnée) diffère de manière significative de celle d'une population qui suit la loi Normale. Ce test de normalité est long à calculer sans logiciel.

22.4 INTERVALLE DE CONFIANCE DE LA MOYENNE

Quand le nombre n de mesures est petit, (n compris entre 4 et 15 par exemple), et qu'il n'y a pas d'erreur systématique, la moyenne vraie m peut être assez différente de la valeur centrale \bar{x} . On est donc réduit à faire son estimation en calculant un intervalle de confiance à l'intérieur duquel on se donne une probabilité que l'on s'impose (par exemple 95 %), que la valeur vraie s'y trouve. Cette opération entraîne un risque d'erreur.

L'intervalle de confiance à prendre autour de \bar{x} , afin qu'il englobe la moyenne vraie m (ou x_0 en l'absence de toute erreur systématique) est donné par la formule suivante :

$$\bar{x} - \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \leq m \leq \bar{x} + \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \tag{22.14}$$

t , paramètre de Student est un facteur statistique qui dépend de n et du niveau de confiance choisi. Ses valeurs sont dans une table (table 22.2). Plus n est grand, plus cet intervalle diminue. s est l'écart-type de la série de mesures.

Ce test de la variable t de Student permet également d'ajuster le nombre de mesures à effectuer pour atteindre un résultat avec un niveau de confiance choisi par avance.

Tableau 22.2 Valeurs du coefficient de confiance bilatéral t (calcul de la distribution de Student).

n	niveau de confiance 90 %	niveau de confiance 95 %	niveau de confiance 99 %
2	6,31	12,71	63,66
3	2,92	4,30	9,93
4	2,35	3,18	5,84
5	2,13	2,78	4,60
6	2,02	2,57	4,03
7	1,94	2,45	3,71
8	1,90	2,36	3,50
9	1,86	2,31	3,36
10	1,83	2,26	3,25
11	1,81	2,23	3,17
12	1,80	2,20	3,11
15	1,76	2,14	2,98
20	1,73	2,09	2,86
30	1,70	2,05	2,76
60	1,67	2,00	2,66
120	1,66	1,98	2,62
9 999	1,65	1,96	2,58

■ Si on connaît, outre la moyenne \bar{x} la valeur vraie x_0 (ou la moyenne vraie m), l'expression 22.14 permettra inversement de calculer la valeur de t , selon le niveau de confiance choisi (expression 22.15 si $n < 20$, ou 22.16). Une valeur de t supérieure à celle de la table, lue à la ligne correspondant à la valeur de n , sera due à une erreur systématique.

$|t| = \frac{|\bar{x} - m|}{s} \sqrt{n} \tag{22.15}$ ou $|t| = \frac{|\bar{x} - x_0|}{\sigma} \sqrt{N} \tag{22.16}$

On calcule également cet intervalle de confiance quand on teste une méthode de dosage avec un échantillon dont on connaît la valeur vraie x_0 correspondante. Il reste à voir si cette dernière est située dans l'intervalle de confiance calculé.

Dans la formule qui permet de calculer l'intervalle de confiance on peut faire apparaître l'*écart-type de la moyenne*, ou incertitude de l'écart type, sachant qu'il répond à la formule suivante (22.17) :

$$s_{\bar{x}} = \pm \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (22.17)$$

22.5 COMPARAISON DE RÉSULTATS — TESTS PARAMÉTRIQUES

Quand il s'agit de comparer les résultats de deux méthodes de dosage sur un même échantillon ou les résultats de deux appareils appliquant la même méthode ou bien encore les résultats de deux laboratoires pour un même échantillon il est d'usage de faire appel à des tests statistiques. Les uns sont appelés *tests paramétriques* qui supposent que les données se distribuent selon une loi Normale (telles les valeurs de la table de Student), et les autres dits *tests non paramétriques* basés sur les statistiques dites robustes, c'est-à-dire peu sensibles à une valeur aberrante. En chimie analytique, on ne recueille pas souvent de grandes quantités de données, si bien que les tests présentent un certain risque, choisi traditionnellement sous forme de pourcentage de 10 ou 5 ou 1 %.

22.5.1 Comparaison de deux variances, loi de Fisher-Snedecor

On recherche si l'écart-type s_1 du premier ensemble de résultats est significativement différent de celui du second ensemble, s_2 . C'est ce qu'on appelle le *test d'égalité de variances*. On calcule le rapport F en plaçant la plus grande variance au numérateur afin que $F > 1$:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (22.18)$$

L'*hypothèse nulle* (terminologie des statisticiens) consiste à dire que s'il n'y a pas de différence significative, le rapport doit être proche de 1. On va donc se reporter à la table des valeurs critiques de F , de Fisher-Snedecor, établie pour des nombres d'observations variées (tab. 22.3). Si la valeur calculée excède la valeur tabulée, les moyennes sont considérées comme significativement différentes. La variance s_1^2 étant supérieure à s_2^2 , la seconde série de mesures est donc plus précise.

■ La transposition de ce test en statistiques robustes (test non paramétrique) consiste tout simplement à faire le rapport $F = R_1/R_2$ des dispersions (écart entre les mesures extrêmes) des deux séries à comparer.

■ Parmi les exemples du tableau 22.1, on trouvera qu'il n'y a pas de différence significative entre les résultats des chimistes 2 et 3 pour un degré de confiance de 95 %. On trouve en effet $F = 1,5$ alors que dans la table, $F = 6,39$.

Tableau 22.3 Abrégé des valeurs seuil de F établi pour un niveau de confiance de 95 %.

Nombre de mesures (dénominateur)	Nombre de mesures (numérateur de la fraction F)						
	3	4	5	6	7	10	100
3	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,38	19,50
4	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,81	8,53
5	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,00	5,63
6	5,79	5,41	5,19	5,05	4,95	4,78	4,36
7	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,10	3,67
10	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,18	2,71
100	2,99	2,60	2,37	2,21	2,09	1,88	1,00

22.5.2 Comparaison de deux moyennes expérimentales \bar{x}_1 et \bar{x}_2

On cherche à savoir si les moyennes obtenues à partir de deux séries de résultats doivent être considérées comme significativement différentes sachant que l’on ignore la valeur vraie. On doit commencer par vérifier qu’il n’y a pas de différence significative concernant les précisions sur ces deux moyennes (cf. 22.5.1). Ensuite on calcule selon l’expression 22.19 l’écart-type s_p groupé (de l’ensemble, *pooled*)) puis la valeur de t correspondante (22.20) qu’il faut comparer à la valeur du tableau pour $n = n_1 + n_2 - 2$ mesures et pour le niveau de confiance choisi. Si la valeur de t dans la table est supérieure à la valeur calculée, on peut conclure que ces deux moyennes ne sont pas significativement différentes.

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \tag{22.19}$$

$$t = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{s_p} \sqrt{\frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2}} \tag{22.20}$$

22.5.3 Estimation d’une limite de détection d’un analyte

Les deux expressions 22.19 et 22.20 sont utiles pour estimer la plus petite concentration d’un analyte pouvant être détectée mais non quantifiée avec un niveau de confiance choisi. On considère que l’une des deux moyennes (\bar{x}_2 par exemple) résulte d’une série de mesures sur le blanc analytique. Elle sera notée \bar{x}_b avec un écart-type s_b . En remarquant, si $n_1 = 1$, que l’expression 22.19 se simplifie en $s_p = s_b$, on écrira (la valeur de t étant extraite du tableau 22.2, à la ligne $n_1 + n_b - 2$) :

$$\Delta x = \bar{x}_1 - \bar{x}_b = \pm t \cdot s_b \sqrt{\frac{n_1 + n_b}{n_1 \cdot n_b}} \tag{22.22}$$

■ Si 6 mesures effectuées sur un blanc analytique conduisent à un écart-type de 0,3 µg pour le dosage considéré, on trouvera — avec 22.22 et pour un degré de confiance de 99 % — 1,31 µg pour limite de détection si on fait une seule mesure et 0,59 µg si on en fait 5, ($\bar{x}_b = 0$). Empiriquement on admet que la limite de détection instrumentale correspond à la concentration qui conduit à un signal dont l’intensité (valeur centrale \bar{x}) relative

est double de l'écart-type calculé sur 10 valeurs obtenues avec le blanc analytique (niveau de confiance de 95 %). La limite de quantification est toujours nettement plus élevée.

22.6 TEST DE REJET – QUOTIENT Q OU TEST DE DIXON

Il peut arriver qu'une valeur dans un ensemble semble aberrante. On peut être tenté de la rejeter, bien qu'une mesure ne soit aberrante qu'en référence à une loi de probabilité donnée. Il existe un critère statistique simple pour conserver ou rejeter cette valeur « hors-la-loi ». On fait le test de Dixon qui consiste à calculer le rapport suivant (à condition qu'il y ait au moins 7 mesures) :

$$Q = \frac{| \text{valeur en question} - \text{valeur la plus proche} |}{(\text{valeur la plus grande} - \text{valeur la plus petite})}$$
 (22.22)

On compare *Q* ainsi calculé à une table des valeurs critiques de *Q* en fonction du nombre de données (tableau 22.4). Si *Q*_{calculé} est supérieur à *Q*_{critique}, la donnée peut être rejetée.

■ Note : la norme ASTM (*American Society for Testing Material*) utilise un test différent, dit de la valeur centrée réduite *e_i* = (*x_i* – *x̄*) assorti d'une table de valeurs critiques qui lui est propre.

Le tracé de la droite de Henry, dont on trouvera le principe dans les livres plus complets traitant des statistiques, constitue également une bonne méthode pour détecter, par une approche visuelle, un point aberrant.

Tableau 22.4 Abrégé de la table des valeurs critiques de *Q* (test de Dixon).
Source : M.Neuilly, *Techniques de l'ingénieur, Analyses et Caractérisation*, 1996

nombre de mesures	niveau de confiance bilatéral	
<i>n</i>	95 %	99 %
3	0,94	0,99
4	0,77	0,89
5	0,64	0,78
6	0,56	0,70
7	0,51	0,64
8	0,47	0,59
9	0,44	0,59
10	0,41	0,53

22.7 COURBES D'ÉTALONNAGE

L'analyse quantitative instrumentale est basée sur des méthodes comparatives. On admettra par exemple que l'échantillon qui contient l'analyte, et un standard qui contient la même quantité de cet analyte donnent avec un instrument dont les réglages n'ont pas été modifiés,

des signaux de sortie identiques. Dans la majorité des cas on préparera non pas une seule mais plusieurs solutions (ou spécimens solides) contenant des concentrations connues en analyte. Pour se mettre à l'abri d'effets de matrice, on pourra utiliser la méthode des additions standard. Les quelques valeurs de référence ainsi obtenues vont être reportées sous forme de points figuratifs sur un graphe dont les abscisses correspondent aux concentrations et les ordonnées aux valeurs de signaux. Suivant l'hypothèse choisie et sachant que la position de chaque point est entachée d'une erreur on va définir la courbe d'étalonnage. Autrement dit on modélise le signal de sortie de l'appareil (placé en Y) en fonction de la concentration (portée en X). On adopte une fonction modèle $Y = F(X)$ qui permet ensuite d'évaluer Y connaissant X et cette fonction. L'incertitude sur le résultat cumule l'incertitude liée à la mesure et sur la forme choisie pour la fonction (qui peut être trop simple ou trop complexe).

L'interprétation des résultats de l'étalonnage fait appel à des méthodes statistiques. Les logiciels d'analyse quantitative utilisent de nombreux modèles de calculs. On se bornera ici de donner les principaux résultats concernant la régression linéaire approche statistique la plus souvent rencontrée en analyse quantitative (fig. 22.3).

22.7.1 Régression linéaire simple

En supposant que la réponse du détecteur est rectiligne pour la variable à mesurer, compte-tenu des écarts dus aux conditions expérimentales ainsi qu'à l'appareil, le but est de déterminer les paramètres de la droite qui correspondent le mieux aux observations. Quelle erreur fait-on ? Tous les points expérimentaux doivent-ils intervenir avec le même poids ? L'ajustement par la *méthode des moindres carrés* considère *a priori* qu'une des deux variables est sans erreur et l'autre soumise à des fluctuations aléatoires. C'est la méthode la plus souvent appliquée. Les coefficients a et b de la droite de régression $y = ax + b$, ainsi que l'écart-type sur a et l'estimation sur y , sont représentés par un certain nombre de formules présentes dans les logiciels de quantitative.

La liaison entre les deux variables est caractérisée par l'estimation du *coefficient de corrélation* de Pearson, R , sans dimension. Une valeur de $+1$ ou de -1 traduit une forte liaison entre les deux variables. Cette méthode suppose au départ que les erreurs sur y suivent la loi de distribution Normale. R^2 est le *coefficient de détermination*. Il permet de savoir quel pourcentage des variations de x recouvre les variations de y .

$$a = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2} \quad (22.23)$$

et

$$b = \bar{y} - a\bar{x} \quad (22.24)$$

$$R = \frac{n \sum x_i y_i - \sum x_i \sum y_i}{\sqrt{[n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2] \cdot [n \sum y_i^2 - (\sum y_i)^2]}} \quad (22.25)$$

Dans ces calculs classiques on considère que l'erreur expérimentale se répercute uniquement en y et qu'elle est indépendante de la concentration placée en x . Si ce n'est pas le cas, les points n'ont donc pas la même qualité pour estimer la droite de régression. D'où l'idée d'affecter moins de valeur aux points éloignés de la droite. On aboutit par des calculs itératifs à l'équation d'une droite qui tient compte d'une pondération de chaque point.

■ Pour rechercher si deux méthodes de dosage donnent des résultats fortement corrélés, on analyse une série de n standards de concentrations différentes par les deux voies. On représente ensuite chaque échantillon par un point sur un graphe en portant en x le résultat de la méthode 1 et en y , celui de l'autre méthode. On détermine le coefficient de corrélation R et on applique la formule 22.26. Si la valeur de t est supérieure à la valeur lue dans la table pour $n - 2$ degrés de liberté, il y a forte corrélation.

$$t = R \sqrt{\frac{n - 2}{1 - R^2}} \quad (22.26)$$

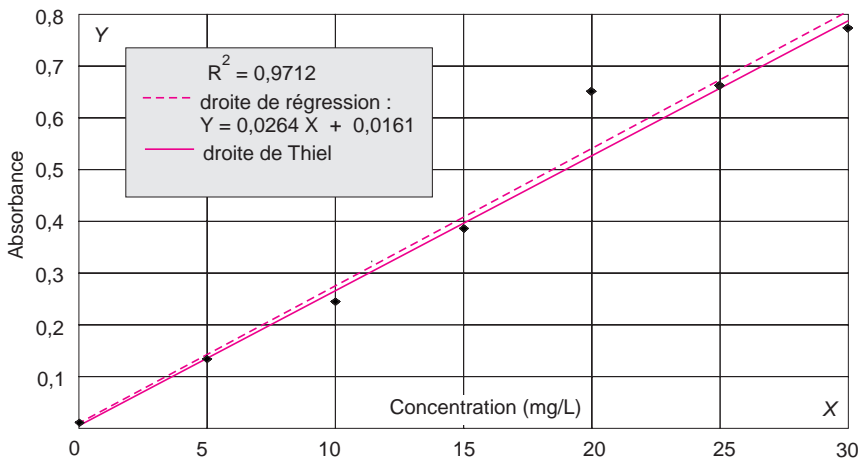


Figure 22.3 Droite de régression et droite de Thiel correspondant aux données du tableau 22.5.

Bien que voisines les deux droites conduisent à des résultats différents. Ainsi pour $y = 0,5$, on trouvera $x = 18,85$ (Thiel) et $x = 18,33$ (régression), soit une différence de près de 3 %.

22.7.2 Régression linéaire multiple

L'analyse par régression linéaire multiple permet de prévoir un résultat (la *variable dépendante*) lorsqu'il dépend d'un certain nombre de facteurs (les *variables indépendantes*). Les tableaux permettent de faire ce type de calcul dans lequel la contribution de chaque facteur est établie à partir d'étalons. La prévision du résultat est calculée par une formule générale, telle 22.27 dans l'hypothèse de trois facteurs :

$$y = a + bx_1 + cx_2 + dx_3 \quad (22.27)$$

■ À titre d'exemple, le taux de protéine d'un fromage et par suite le % d'azote (résultat) peuvent être établis à partir de l'absorbance IR mesurée à plusieurs longueurs d'onde. Cette méthode est également utilisable pour calculer les paramètres A , B et C de l'équation de Van Deemter (§ 1.10), correspondant aux données expérimentales.

22.8 MÉTHODES ROBUSTES OU TESTS NON-PARAMÉTRIQUES

Les tests statistiques développés ci-dessus supposent que les résultats suivent la loi de distribution Normale. Or il existe des méthodes d'analyse dont les résultats montrent des distributions différentes. Ou bien elles ne sont pas symétriques, ou bien elles sont symétriques mais non normales. On les considère, dans certains calculs, comme résultant de la superposition d'une distribution normale et de points aberrants. L'usage de la médiane (cf. 22.1), à la place de la moyenne arithmétique, fait partie de cet autre type d'approche. L'écart-type est remplacé par la déviation moyenne DM .

$$DM = \sqrt{\frac{\pi}{2}} \cdot \frac{\sum |x_i - \bar{x}|}{n} \tag{22.28}$$

De même, le tracé d'une droite d'étalonnage peut être reconsidéré, comme le montre l'exemple suivant qui illustre la méthode de Thiel.

Soit à estimer la meilleure droite pour les sept couples de points (x, y) d'un dosage colorimétrique où l'on a pris soin tout d'abord de classer x dans l'ordre croissant (fig. 22.4). La méthode exigeant un nombre pair de points, on rejette dans notre cas la valeur médiane.

La démarche du calcul est la suivante. On calcule tout d'abord les pentes des trois droites qui passent, pour la première d'entre elles, par le premier point et celui qui suit immédiatement la valeur médiane et ainsi de suite pour les deux autres. On prend la valeur médiane des trois valeurs ainsi calculées, qui devient le terme a de la droite cherchée. On calcule maintenant les 6 $b_i = y_i - ax_i$. Enfin on classe ces 6 valeurs pour en extraire la médiane qui devient le terme b de la droite (fig. 22.3 et 22.4).

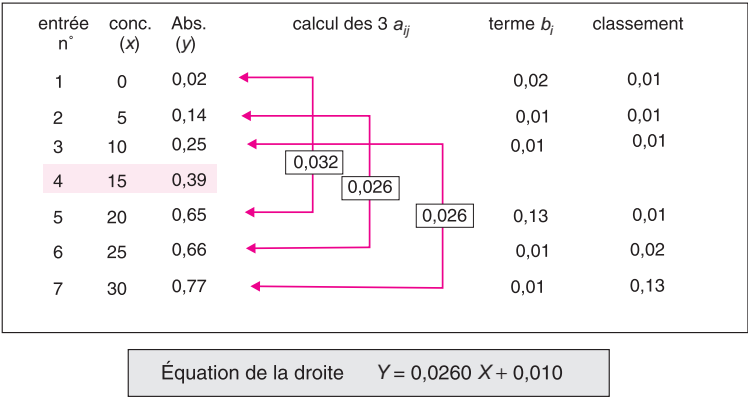


Figure 22.4 Conduite du calcul de la droite par la méthode de Thiel ($y = ax + b$).

En chimie cette méthode gagnerait à être plus utilisée lorsqu'on ne dispose pas d'assez de mesures pour faire une étude sérieuse de la normalité de la distribution.

Trois points, qui peuvent être des avantages, méritent d'être soulignés :

- on ne suppose pas que toutes les erreurs sont en y ;
- on ne suppose pas d'abord que ces erreurs suivent une distribution normale ;
- on remarque qu'un point aberrant n'affecte pas la droite.

22.9 OPTIMISATION PAR LA MÉTHODE UN SEUL FACTEUR À LA FOIS

Lorsqu'un dosage dépend d'un signal de mesure (absorbance, ou intensité de fluorescence...) qui est lui-même influencé par plusieurs facteurs, on recherche généralement les conditions qui conduisent globalement au signal le plus élevé.

Si les facteurs sont indépendants, on peut étudier l'influence de chacun d'eux sur le résultat global par une méthode répétitive simple comme il est indiqué dans l'exemple suivant.

Supposons que la valeur donnée par un capteur de détection dépende de deux facteurs indépendants x et y . Après avoir fixé le facteur x à la valeur x_1 , on étudie l'influence sur le signal (3^e dimension) du second facteur y . On observe que pour la valeur Y , le signal passe par un maximum. On choisit cette valeur Y et on fait maintenant varier x en suivant l'évolution du signal de façon à optimiser sa valeur, soit X (fig. 22.5). Généralement en répétant ce procédé on trouve un nouveau couple XY donnant un signal un peu meilleur.

Cette méthode répétitive ne constitue pas toujours la meilleure approche du problème. Si les courbes d'isoréponses forment des surfaces complexes présentant notamment une arête, illustration mathématique d'une interaction entre les deux facteurs, la méthode précédente peut conduire à un faux optimum suivant les paramètres choisis au départ. En fait il est préférable de faire varier tous les facteurs à la fois. Cette approche différente a pour but de trouver les conditions optimales avec le minimum d'essais. Elle est illustrée par la méthode d'optimisation simplexe séquentielle et par les plans d'expérience expliqués dans des ouvrages spécialisés.

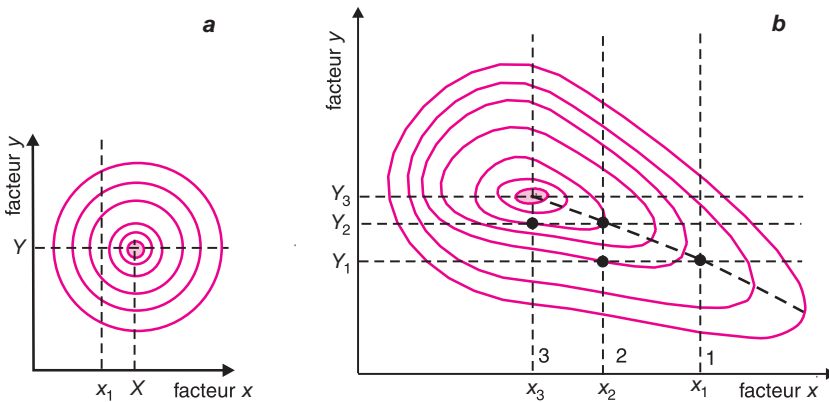


Figure 22.5 Méthode "un seul facteur à la fois".

Si on a une surface continue de réponse, et qu'on ait établi les courbes d'isoréponses, on pourra se trouver en présence de plusieurs situations type.

EXERCICES

Solutions en fin d'ouvrage

Exercice 22.1

Avec la même colonne dont la phase stationnaire est du squalane, et dans des conditions différentes d'utilisation, on détermine l'indice de Kovats du benzène (valeur reconnue moyenne : 653). On trouve les valeurs suivantes : 650, 652, 648, 651, et 649. significativement différente de l'ensemble des valeurs calculées ?

La valeur de 653 est-elle significativement différente de l'ensemble des valeurs calculées ? (On se fixera un niveau de confiance de 95 %).

Exercice 22.2

a) La valeur vraie d'un dosage est de $131,9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Quatre chimistes (A à D) répètent chacun 6 fois le dosage. Ils trouvent les valeurs individuelles suivantes. Commentez les résultats en termes de justesse et de précision (utiliser l'indicateur de dispersion ou écart-type s).

Chimiste A	130,7	131,6	133,5	132,3	132,6	129,1
Chimiste B	125,0	132,3	136,9	137,9	125,9	131,6
Chimiste C	136,7	134,5	134,1	135,4	136,0	137,3
Chimiste D	130,7	109,9	131,9	115,6	131,3	132,6

b) On suppose que les deux chimistes A et B ont utilisé deux appareils distincts. Appliquer le test d'égalité de variances (F) afin d'indiquer si les précisions des appareils sont significativement différentes.

Exercice 22.3

En reprenant les résultats trouvés par les chimistes A et C (voir problème 22.2), ainsi que la valeur vraie (131,9) calculer les valeurs correspondantes du paramètre t de Student.

Peut-on conclure s'il y a présence d'une erreur systématique pour A ou pour C ?

Exercice 22.4

a) Les résultats d'un dosage répété 5 fois sont les suivants : 24,24 ; 24,36 ; 24,8 ; 24,20 ; 24,10. Vérifier si la troisième valeur, qui semble trop grande, mérite d'être considérée comme une valeur aberrante.

b) On procède à deux mesures complémentaires qui sont de 24,12 et 24,25. Revoir la question posée ci-dessus et conclure en s'appuyant sur le calcul des écarts-types.

Exercice 22.5

Pour deux méthodes différentes, les mesures répétées 7 fois chacune pour un dosage, donnent : moyenne 42 ($s = 0,3$) et moyenne 45 ($s = 0,2$).

Ces deux méthodes donnent-elles des résultats significativement différents ?

Exercice 22.6

Un composé est accompagné d'un certificat d'analyse indiquant que sa pureté est de 99 % avec $s = 0,08$ établi sur 5 mesures. Un dosage de contrôle répété 4 fois sur ce composé conduit aux valeurs suivantes 98,58 ; 98,91 ; 98,62 et 98,80. La valeur d'origine est-elle à rejeter ?

Exercice 22.7

Une série de solutions étalons utilisées en absorption atomique conduit aux mesures suivantes :

concentration $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1	2,5	5	10	20	30
absorbance	0,06	0,19	0,36	0,68	1,21	1,58

a) Peut-on utiliser une méthode de régression linéaire ?

b) Si oui, pour quel domaine de concentrations ?

Exercice 22.8

Une méthode de dosage doit être répétée 5 fois. 8 mesures successives du blanc analytique ont donné les valeurs suivantes : 0,3 ; 0,75 ; -0,3 ; 1,5 ; -0,9 ; 1,8 ; 0,6 ; 1,2.

Calculer la limite de détection en adoptant un degré de confiance de 99 %.

RÉPONSES AUX EXERCICES

Exercice 1.1

Après équilibre, les 40 mL d'éluant contiennent $12 \times 40/10 = 48$ mg de composé. Dans la phase stationnaire, il y en a donc $100 - 48 = 52$ mg. En appelant K le rapport des masses présentes dans un mL de chaque phase en équilibre, $K = (52/6)/(48/40) = 7,2$.

Exercice 1.2

Sachant que $V_R = t_R \cdot D$, on a : $\alpha = (V_{R(2)} - V_M)/(V_{R(1)} - V_M)$, soit $\alpha = 1,2$.

Exercice 1.3

On a $t_R = t_M(1 + k)$. Or $t_M = L/\bar{u}$ et $k = K V_S/V_M$ d'où $t_R = (L/\bar{u})(1 + K V_S/V_M)$.

Exercice 1.4

Pour transformer l'expression 1 en 2, on fait apparaître k , à partir de $t_M = t_R/(1 + k)$.

Exercice 1.5

a) Si les pics sont voisins, les largeurs à la base sont en général comparables. En posant $\omega_1 = \omega_2$ et en exprimant ω_2 par sa valeur en fonction de N_2 , on obtient $R = 1/4\sqrt{N_2}(t_{R(2)} - t_{R(1)})/t_{R(2)}$. Puis on fait apparaître k , en utilisant $t_R = t_M(1 + k)$; enfin, on introduit $\alpha = k_2/k_1$;

b) La relation donnée dans l'énoncé est obtenue à partir de la relation trouvée de R (en fonction de k et de α) et de l'expression 2 de l'exercice 1.4.

Exercice 1.6

1) À partir de la relation de base $R = 2(t_{R(2)} - t_{R(1)})/(\omega_1 + \omega_2)$ on peut remplacer ω par sa valeur en fonction de N , $\omega = 4t_R/\sqrt{N}$ et comme $t_R = t_M(1 + k)$, on obtient bien l'expression (1) ;

2) On multiplie le second membre de (1), numérateur et dénominateur par $(k_1 + k_2)$ et on fait apparaître α ($\alpha = k_2/k_1$).

Exercice 1.7

$$f_t = 1,012$$

Exercice 1.8

$$\% \text{ (ME)} = 16,6; \quad \% \text{ (EE)} = 16,6; \quad \% \text{ (PE)} = 33,4; \quad \% \text{ (BE)} = 33,4.$$

Exercice 1.9

a) En ajoutant la N-méthylsérotonine avant extraction, on n'a pas à tenir compte des pertes éventuelles de produit dues aux différentes manipulations. On suppose que le rendement d'extraction est le même pour les deux composés qui sont très semblables ;

b) $k_{S/NMS} = 1,002$;

c) masse sérotonine : 45 ng/mL.

Exercice 2.1

- 1) Pour des remplissages identiques (même porosité ε_C) on a $\bar{u}_1/\bar{u}_2 = 1,06$.
 2) $V_R = 48 \times 4 = 192 \text{ } \mu\text{L}$ ou $0,192 \text{ mL}$ (une économie de solvant).
 3a) Les volumes morts sont dans le même rapport que les sections des deux colonnes :

$$V_{M(0,3)}/V_{M(4,6)} = 0,0043.$$

Le volume de rétention sur la colonne (0,3 mm) est donc égal au volume de rétention de la colonne (4,6 mm) multiplié par 0,0043 (soit 235 fois moins).

- 3b) La quantité de produit injecté étant la même, le produit sera 235 fois moins dilué dans la phase mobile et le signal sera donc en théorie 235 fois plus intense (sensibilité accrue pour la détection).

Exercice 2.2

Les composés seront élués dans l'ordre 1, 3 et 2.

Exercice 2.3

(1,c) phase inversée ; (2,a) perméation de gel ; (3,d) chrom. ionique ; (4,b) phase normale.

Exercice 2.4

- a) Si α est égal à 1, les pics sont confondus, les temps de rétention sont identiques ce qui implique que k , donc $\log k_A = \log k_B$. Le % en MeCN doit vérifier les deux expressions :
 $-0,0107 [\% \text{ MeCN}] + 1,5235 = -6,075 \times 10^{-3} [\% \text{ MeCN}] + 1,3283$. On trouve MeCN = 42,2 % ;
 b) Composé A : $k_{30} = 14$; $k_{70} = 8$; composé B : $k_{30} = 16$; $k_{70} = 6$. Pour 30 % de MeCN : $\alpha = 1,143$ et pour 70 % de MeCN : $\alpha = 1,333$. En appliquant la formule donnant la résolution en fonction de k et α , on trouve que le terme en α et k vaut 0,222 pour 70 % et 0,118 pour 30 %. Ainsi il est préférable d'utiliser la phase mobile à 70 % de MeCN (séparation beaucoup plus rapide).

Exercice 3.1

- a) N_{eff} , k , α ; CPG : méthane.
 b) L'expérience décrite nous permet de poser 3 équations, pour 3 inconnues t_M , a et b :
 $\log(271 - t_M) = 6a + b$; (2) $\log(311 - t_M) = 7a + b$; (3) $\log(399 - t_M) = 8a + b$, soit $t_M = 237,7 \text{ s}$.
 c) $Ik = 749$. La constante de Mc Reynolds de la pyridine sur la phase stationnaire est 54.

Exercice 3.2

L'indice de Kovats du butanol est donc de 645. Sa constante de McReynolds est de : $645 - 590 = 55$.

Exercice 3.3

On considère que le volume V qui sort de la colonne par seconde est égal au volume interne de la colonne sur une longueur \bar{u} . La section de la colonne étant $\pi d_C^2/4$ d'où $V = \bar{u} \pi d_C^2/4$. Le débit \mathcal{D} exprimé en mL/min (si \bar{u} et d_C sont en cm) vaut donc $\mathcal{D} = 60V$. Si on choisit d'exprimer d_C en mm, on écrira : $\mathcal{D} = 60\bar{u}\pi(0,1)^2 d_C^2/4$ soit $\mathcal{D} = 0,47\bar{u}d_C^2$.

Exercice 3.4

- a) L'ordre d'élution suit celui des points d'Eb. croissants. Les alcènes, plus polaires que les alcanes correspondants, sont moins retenus, ce qui est attendu d'une colonne non polaire ;
 b) $\alpha = k_2/k_1$: $\alpha = 1,12$ (à -35°C), $\alpha = 1,11$ (à 25°C) et $\alpha = 1,09$ (à 40°C) ;
 c) la colonne étant la même, le temps de rétention décroît par suite de la diminution du coefficient de partage $K = C_S/C_M$ avec la température ; $N = 138\,493$ plateaux théoriques ;
 e) $H_{\text{min théo}} = 0,113 \text{ mm}$.

Exercice 3.5

- b) t_R proportionnel à la longueur ;
- c) R proportionnelle à \sqrt{L} ;
- d) δ proportionnelle à \sqrt{L} et N proportionnelle à L ;
- e) $\delta = 0,0568$ min, $N_{60} = 148\,166$ plateaux ;
- f) $N_{30} = 74\,083$ plateaux et $N_{15} = 37\,041$ plateaux.

Exercice 4.1

- a) Une telle phase correspond à un polymère ($250\,000 < M < 900\,000$) qui comporte des groupements acides $-\text{CH}_2\text{COOH}$. Elle est du type cationique faible. Le pH de la séparation étant inférieur aux pI classiques des protéines, celles-ci sont protonées sur les fonctions basiques ($-\text{NH}_3^+$) ;
- b) Si on augmente le pH on va diminuer le caractère ionique et les protéines vont être éluées plus vite. Ici $\text{pI}_1 < \text{pI}_2 < \text{pI}_3$.

Exercice 5.1

- a) $R_{f(A)} = 0,45$; $R_{f(B)} = 0,55$; $N_A = 2\,916$; $N_B = 2\,788$; $H_A = 9,26 \times 10^{-4}$ cm ; $H_B = 1,18 \times 10^{-3}$ cm.
- b) $R = 2,67$;
- c) $\alpha = 1,49$.

Exercice 5.2

- a) Comme il s'agit d'une phase normale, le composé le plus polaire sera le plus retenu. Par ordre de migration croissante, on aura d'abord C, puis B et enfin A ;
- b) L'ordre d'élution serait A, B et C ;
- c) L'ordre inverse ;
- d) $R_{f(A)} = 0,45$; $N = 635$; HEPT = 0,1 mm.

Exercice 7.1

- a) Le volume d'exclusion est d'environ 4,5 mL. Celui des pores est d'environ 3,75 mL ;
- b) Pour la masse de 3 250 Da, $K = 0,29$;
- c) En chromatographie d'exclusion stérique $K < \text{ou} = 1$, sauf si des interactions entre soluté et phase stationnaire se manifestent, ce qui crée un phénomène de partition classique qui se superpose à la diffusion dans les pores.

Exercice 7.2

En mettant bout à bout les colonnes C et A les quatre étalons de polystyrène seront séparés : on obtiendra donc 4 pics distincts.

Exercice 7.3

- a) $M = 30\,475$ Daltons ;
- b) (2) $M_N = \frac{\sum_i A_i}{\sum_i \frac{A_i}{M_i}}$ et (3) $M_W = \frac{\sum_i A_i \cdot M_i}{\sum_i A_i}$;
- c) tableau

Mi	90 772	73 800	60 016	48 830	39 756	32 398	2 6431	21 593	17 668	14 482	11 895	9 792
----	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	-------

$M_N = 31\,210$ Daltons, $M_W = 33\,134$ Daltons.

Exercice 8.1

- a) $\mu_{EP} = 2,88 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$;
- b) $D = \ell^2 / (2N \cdot t_M) = 2,5 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$.

Exercice 8.2

- a) Non, car il s'agit d'une paroi non traitée. Il se crée donc un flux électro-osmotique. Le composé migre vers la cathode, même s'il porte une charge négative ;
- b) $\mu_{app} = 7,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$;
- c) $\mu_{EOS} = 1,5 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$.
- d) $\mu_{EP} = -7,5 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{V}^{-1}$. Le signe (négatif) de μ_{EP} symbolise qu'il s'agit d'une espèce porteuse d'une charge nette négative. Le composé va moins vite qu'un marqueur neutre ;
- e) Si la paroi du capillaire est rendue neutre, il n'y aura plus de flux électro-osmotique et par conséquent le composé ne migrera plus vers la cathode ;
- f) Si le pI est de 4, pour tout pH inférieur à 4, le composé sera sous la forme d'un cation. Dans ce cas, le temps de migration sera normalement plus court que pour un marqueur neutre ;
- g) $N = 337\,500$ plateaux ;
- h) Une petite molécule diffuse plus vite qu'une grosse molécule. Par conséquent l'efficacité est meilleure pour les molécules de masses élevées.

Exercice 8.3

$M = 29\,854$ Da. On remarquera que la phase stationnaire ne se comporte pas tout à fait comme un gel de CES. Elle fait obstacle aux grosses molécules qui migrent donc moins vite que les plus petites.

Exercice 9.1

La concentration d'une solution à 0,1 ppm est de $0,1 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ soit $1,92 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.
 À partir de $A = \varepsilon \cdot \ell \cdot c$, on trouve $\ell = 4,98 \text{ cm}$. Une cuve de 5 cm d'épaisseur est donc bien adaptée.

Exercice 9.2

- a) Si $T = 0,5$, $A = \log 1/0,5 = 0,3$; $\varepsilon = 2\,344 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.
- b) Si on double la concentration, $A = 0,6$. Donc $\log 1/T = 0,6$ soit $T = 0,25$.

Exercice 9.3

Si 90 % du rayonnement est absorbé, $T = 0,1$. Donc $A = 1$ et $c = 2,22 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Pour $M = 500 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, on trouve $c = 1,11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Exercice 9.4

a) Valeurs des $\varepsilon (\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$: $\varepsilon_{A(510)} = 4,76$; $\varepsilon_{B(510)} = 4,967$; $\varepsilon_{A(575)} = 0,647$; $\varepsilon_{B(575)} = 12,617$.

b) $C_A = 1,2 \times 10^{-1} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et $C_B = 2 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Exercice 9.5

a) $y = 1,784x + 0,815$ en posant $y = A_{\text{échantillon}}/A_{\text{permanganate}}$ et $x = A_{\text{bichromate}}/A_{\text{permanganate}}$.

b) $c_{\text{permanganate}} = 8,15 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et $c_{\text{bichromate}} = 1,78 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

Exercice 9.6

Le molybdate étant en grand excès, on peut considérer sa concentration constante, la loi de vitesse devient : $-\frac{d[F]}{dt} = k'[F]$ dans l'hypothèse d'une cinétique du premier ordre par rapport au fructose soit $\ln \frac{[F]}{[F]_a} = -k' \cdot t$ ce qui ramené en absorbance donne : $\ln \frac{A_\infty - A_t}{A_\infty} = -k' \cdot t$. Les valeurs de k' sont pratiquement égales, ce qui confirme l'ordre 1 et la valeur moyenne de k' est $0,0348 \text{ min}^{-1}$.

Exercice 10.1

a) $E = 1,99 \times 10^{-20} \text{ J}$. Rapporté à une mole on trouvera $12\,000 \text{ J}$ (soit $2,87 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$).

b) $\bar{\nu} = 666,67 \text{ cm}^{-1}$ (ou $66\,667 \text{ m}^{-1}$); $\lambda = 5,88 \mu\text{m}$.

Exercice 10.2

En admettant que la constante de force k reste la même pour les deux espèces (ce sont des isotopes d'un même élément) on trouve $\bar{\nu}_D = 2\,215 \text{ cm}^{-1}$ (écart inférieur à 2 % avec la valeur exp.).

Exercice 10.3

Un photon correspondant à $2\,000 \text{ cm}^{-1}$ transporte une énergie de $E = hc/\lambda = 3,972 \times 10^{-20} \text{ J}$. Cette énergie se retrouve sous forme d'énergie mécanique : $E_{\text{tot}} = E_{\text{cin}} + E_{\text{pot}}$. Au maximum d'élongation Δx , $E_{\text{cin}} = 0$ car la vitesse est nulle. L'énergie E du photon est donc entièrement sous forme d'énergie potentielle : $\Delta E_{\text{pot}} = 1/2k \cdot (\Delta x)^2$; $\Delta E_{\text{pot}} = E$ apportée par le photon. $\Delta x = 8,91 \times 10^{-12} \text{ m}$ soit environ 6 % d'une liaison dont la longueur serait de $0,15 \text{ nm}$.

Exercice 10.4

La masse réduite approximative est : $1,138 \times 10^{-26} \text{ kg}$; on trouve $k = 1\,845 \text{ N} \cdot \text{m}^{-1}$.

Exercice 10.5

a) Pour un indice relatif de $2,4/1,4 = 1,714$ l'angle critique α est tel que $\sin \alpha = 1/1,714$ soit $\alpha = 35,7^\circ$.

b) Nombre de réflexions sur la face supérieure : 4 (en admettant que le faisceau incident arrive perpendiculairement à la face d'entrée).

c) Pour $4\,000 \text{ cm}^{-1}$, soit $\lambda = 2,5 \mu\text{m}$, épaisseur équivalente $4 \times 2,5 = 10 \mu\text{m}$ (pour 400 cm^{-1} , $100 \mu\text{m}$).

d) Il faut multiplier l'absorbance par un facteur dont la valeur croît en fonction de la longueur d'onde.

Exercice 10.6

a) $y_1 = 0,0009x + 0,0003$, avec $y_1 = A_{1030}/\mu\text{m}$ de film et $x = \%\text{AV}$.

b) $y_2 = 0,0531x + 0,0047$ avec $y_2 = A_{1030}/A_{720}$ et $x = \%\text{AV}$.

c) $\%\text{AV} = 8,4$ à partir de a) et $\%\text{AV} = 8,46$ à partir de b).

Exercice 10.7

a) 3 040, 2 959, 2 924, 2 849 cm^{-1} ;

b) Il s'agit de vibrations d'élongation des liaisons C-H aromatiques pour la première, alcaniques pour les trois autres ;

(c)) CCl_4 n'apporte pas de liaisons C-H ;

$A_{\text{tot}} = 2,21 \times 10^{-2}C - 2,07 \times 10^{-4}$, ($r = 0,999999$) ; $C = 0,222 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Exercice 11.1

Il s'agit d'une méthode d'ajout. La concentration de la solution de Fe(II) est de $3,07 \times 10^{-5} \text{ M}$.

Exercice 11.2

La concentration de la solution échantillon est de $(60/40) \times 0,1 = 0,15 \text{ ppm}$ soit 150 ppb.

Exercice 11.3

On commence par corriger les valeurs lues pour les trois solutions en retranchant celle du blanc analytique. On trouve $x = 1,062 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Cette valeur correspond à la masse de benzopyrène qui se trouve dans 1 L d'air. La concentration massique est $1,06 \times 10^{-6}/1,3 = 0,815 \text{ ppm}$ soit 815 ppb.

Exercice 11.4

a) $I_f = 1,773 \times 10^6 C + 2,22$;

b) $c = 6,25 \times 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ soit 62,5 ppm.

Exercice 11.5

À 250 nm correspond un nombre d'onde de $40\,000 \text{ cm}^{-1}$. Le pic Raman de l'eau sera donc situé à $40\,000 - 3\,380 = 36\,620 \text{ cm}^{-1}$, ce qui correspond à une longueur d'onde de 273,1 nm.

Exercice 12.1

a) Il faut au moins 1 électron dans l'état $n = 2$ (« couche » L) ;

b) Parce que les constituants de l'air absorbent de manière non négligeable le rayonnement de fluorescence X de faible énergie. L'hélium est pratiquement transparent.

Exercice 12.2

a) $2d \sin \theta = k\lambda$ (ici $k = 1$) ; $\sin \theta = 0,9226$ soit $\theta = 67,31^\circ$. La déviation $2\theta = 134,62^\circ$.

b) $E = hc/\lambda$, soit $E = 9,517 \times 10^{-15} \text{ J}$ ou 59 480 eV.

Exercice 12.3

Pour la raie $K\alpha$ du titane 57 % du rayonnement est absorbé par le film d'aluminium. Pour la raie $K\alpha$ de l'argent seulement 1 % de ce rayonnement plus énergétique sera absorbé.

Exercice 12.4

- a) $\Delta E/E = \Delta\lambda/\lambda$, soit $\Delta E = E\Delta\lambda/\lambda = 1,9284 \times 10^{-19}$ J ou 1,2 eV ;
 b) On ne pourra distinguer ces deux transitions de l'atome de soufre ;
 c) Une variation de 2×10^{-4} nm correspond à une différence d'énergie de moins de 1 eV, qui demeurera invisible sur le spectre.

Exercice 12.5

$x = 0,30$ %.

Exercice 12.6

- a) $I = 69,867$ %_{m/m} – 0,056, ($r = 0,995$) ;
 b) 3,336 %

Exercice 12.7

- a) N₂ : 77,78 % ; O₂ : 22,22 % ;
 b) $\mu_M = 19,81$ cm²·g⁻¹ ;
 c) 89,85 % ;
 d) 99,93 % conclusion : l'hélium transmet beaucoup plus d'énergie que l'air, c'est pourquoi on a purgé l'appareil pour remplacer l'air par de l'hélium ;
 e) $I = 63,64x + 17,96$ où x est le pourcentage en masse de Al ($r = 0,9997$) ;
 f) 0,315 %

Exercice 13.1

Pour une température donnée, $R = N_e/N_0 = g \cdot \exp(-\Delta E/kT)$. En désignant par R_2/R_1 le rapport des deux valeurs de R à 2 000 et à 2 500 K, on trouve : $R_2/R_1 = 11,5$. Le dosage sera environ 12 fois plus sensible à 2 500 qu'à 2 000 K.

Exercice 13.2

Concentration en potassium du sérum : $4,84 \times 10^{-3}$ mol·L⁻¹ (ou 4,84 mmol·L⁻¹).

Exercice 13.3

Le potassium s'ionise plus facilement que le sodium, ce qui diminue l'ionisation du sodium après son atomisation.

Exercice 13.4

L'échantillon introduit dans le four graphite contient $m_x = 1,22 \times 10^{-4}$ g de plomb soit 1,22 %.

Exercice 13.5

- a) Il s'agit de la bande spectrale qui est sélectionnée par la fente de sortie et qui atteint le détecteur.
 b) La formule brute de l'acide EDTA est C₁₀H₁₆N₂O₈ celle du sel mixte de zinc et de sodium, C₁₀H₁₂N₂O₈Na₂Zn. À l'état anhydre, ce sel a pour masse 399,6 g·mol⁻¹, celle du sel hydraté est de 471,6 g·mol⁻¹. Il s'agit donc d'un hydrate à 4 molécules d'eau ;
 c) $C = 1,14$ mg·L⁻¹.

Exercice 14.1

$$\Delta\lambda > 1,84 \times 10^{-13} \text{ m } (1,84 \times 10^{-4} \text{ nm}).$$

Exercice 14.2

[Rapport signal Pb/Mg]=8,219[conc.]+0,345 d'où A = 0,118 mg/L et B = 0,376 mg/L.

Exercice 14.3

Cette expression signifie que le saut d'énergie de $16\,960 \text{ cm}^{-1}$ correspond à la raie de résonance. Cette unité est employée pour mesurer les énergies ($E = h\nu = hc/\lambda$) ; $\lambda = 589,62 \text{ nm}$: il s'agit de la composante du doublet que l'on appelle raie de résonance ($E = 2,102 \text{ eV}$). La seconde composante du doublet n'est pas une raie de résonance.

Exercice 14.4

a) Par application de l'expression $d(\sin \alpha + \sin \beta) = n\lambda$ on calcule 2 valeurs de n correspondant aux 2 valeurs de l'angle d'observation β données dans l'énoncé, (avec $\alpha = 65^\circ$), soit $n_1 = 52,34$ et $n_2 = 53,49$. Donc $n = 53$;

b) La même expression utilisée pour calculer cette fois les longueurs d'onde extrêmes donne : pour $n = 53$, λ de 0,3457 à 0,3533 μm ; pour $n = 52$, λ de 0,3523 à 0,3600 μm et pour $n = 54$, λ de 0,3393 à 0,3467 μm ;

c) Il y a recouvrement des plages.

Exercice 14.5

a) correction du bruit de fond = $\frac{A_{324,719} + A_{324,789}}{2} = 15,6$ pour l'étalon, = 18,35 pour l'échantillon ;

b) correction due au fer = $\frac{10,5 \cdot 2,94 \cdot 10^4}{8,75 \cdot 10^5} = 0,353$;

c) C = 9,13 ppm.

Exercice 15.1

$$\gamma = 4\pi\mu_z/h ; \gamma = 2,674 \times 10^8 \text{ rad} \cdot \text{T}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}.$$

Exercice 15.2

$N_{E(1)}/N_{E(2)} = e^{\Delta E/kT}$; on trouve 1,0000095. Si $B_0 = 7 \text{ T}$, ce rapport est égal à 1,0000477.

Exercice 15.3

a) 7 Hz correspondent à 1,4 mm ;

b) Si l'appareil, pour ^1H , fonctionne à 200 MHz, pour le ^{13}C la fréquence est $\nu_C = \nu_H \gamma_C / \gamma_H$ soit $\gamma_C = 200 \times 1/3,98 = 50 \text{ MHz}$; 7 Hz correspondront à 5,6 mm.

Exercice 15.4

a) $\delta = 2,75 \text{ ppm}$;

b) 300 Hz ;

c) Les déplacements chimiques en ppm sont invariants.

Exercice 15.5

La fréquence de résonance du ^{19}F : 188,255 MHz. Donc entre les deux noyaux il y a 11,745 MHz. La distance entre les signaux serait 1 174,5 m.

Exercice 15.6

- a) A : CHFClCFCl_2 (dd, $J = 70$ et 7 Hz) B : CHF_2CCl_3 (t, $J = 70$ Hz);
 b) C : $\text{CHCl}_2\text{CF}_2\text{Cl}$ (t, $J = 7$ Hz).

Exercice 15.7

Masse molaire trouvée de l'aldéhyde salicylique : $121,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Exercice 16.1

La composition est de 65 % de vanilline naturelle et 35 % de vanilline de synthèse.

Exercice 16.2

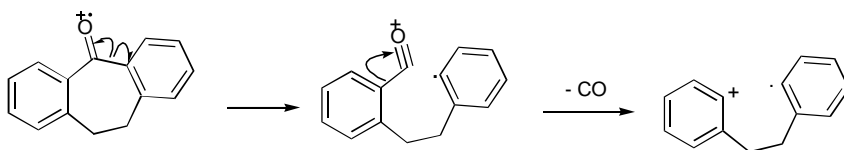
- 1) $X = 0,899 \text{ g}$ d'élément lutétium ;
 2 a) On a ajouté $9,013 \mu\text{g}$ de ^{176}Lu dans le prélèvement de 1 L .
 b) Méthode couplée ICP/SM ;
 d) $x = 0,1088$;
 e) $8\,262 \text{ L}$.

Exercice 16.3

- a) Solution approchée : $0,5 \text{ ppm}$;
 b) Solution plus rigoureuse : $0,513 \text{ ppm}$;
 c) Si Ti ou Cr étaient présents dans cet acier, il y aurait déjà un pic à la masse nominale 51 dû au Cr et l'intensité du pic de masse 50 serait perturbée par la présence du Ti.

Exercice 16.4

- a) $208,088815 \text{ u}$.
 b) Les deux modes de décomposition correspondent à une perte de masse paire (28 u). Les ions formés ($m/z = 180$) sont donc d'après la règle générale pour les composés CHO, des cations radicaux.



- c) Par perte de CO : $m/z = 180,0939$. Par perte de C_2H_4 , $m = 180,05732$. Sur un enregistrement en haute résolution, on peut déduire que le pic le plus à droite correspond aux ions formés à partir de l'ion parent par perte de CO.
 d) La formule brute de cet ion est donc $\text{C}_{14}\text{H}_{12}$. Le second pic a pour formule $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}$;
 e) On calcule les masses exactes des 3 isotopomères composant le pic $M+1$ (formules brutes données dans a), $a = 209,09217$; $b = 209,095054$ et $c = 209,09321 \text{ u}$. Les écarts entre ces valeurs sont très inférieurs à la valeur de ΔM calculée d'après la valeur de R ($0,012 \text{ u}$). Dans les conditions de cette expérience, ces trois types de molécules apparaîtraient donc confondus.

Exercice 16.5

Pic 720 : $I = 0,989^{60} = 0,515$; pic 721 : $I = 0,989^{59} \times 0,011 \times 60 = 0,344$; $(M+1)/M = 66,7 \%$.

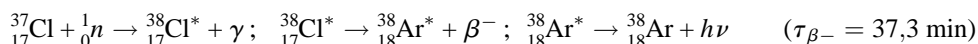
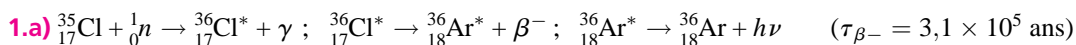
Exercice 17.1

Appelons A_S l'activité spécifique (par g) du marqueur, m_S la masse de ce marqueur utilisée, A_X l'activité (par g) après récupération et m_X la masse inconnue de pénicilline dans l'échantillon prélevé. $M_S = 1 \times 10^{-2}$ g ; $A_S = 75\,000$ Bq/g ; $A_X = 6\,667$ Bq/g ; $m_X = 0,102$ g. Dans 1 g d'échantillon il y a donc 2 fois plus de pénicilline, soit 0,204 g (20,4 %).

Exercice 17.2

- a)** Concentration de la solution étalon de patuline : 1,54 ppm ou 1×10^{-5} ;
- b)** % d'absorbance (ou d'inhibition) par rapport au tube 1 : tube 2 : 45,63 % ; tube 3 : 56,63 % ; tube 4 (éch.) : 48,54 %
- c)** L'absorbance du tube 1 est plus grande car s'il n'y a pas d'analyte introduit dans le tube, tous les sites d'anticorps sont occupés par le conjugué enzymatique.
- d)** La quantité de patuline dans le tube 2 (2 mL) est de $1 \times 10^{-5} / 1\,000 = 1 \times 10^{-8}$ mol, (1,54 μ g), soit $770 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (avec $\log c = 2,8865$). Dans le tube 3 la quantité molaire de patuline est deux fois moindre, soit $0,5 \times 10^{-8}$ mol, (0,77 μ g) soit : $385 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (avec $\log c = 2,5854$).
- e)** La solution initiale contient $0,93 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (soit 930 ppb) de patuline.

Exercice 17.3



1.b) La période étant courte, on peut, par comptage sur une période de quelques heures et avec l'aide d'un logiciel, identifier la fraction de cet isotope par rapport au rayonnement constant des émetteurs à périodes longues (moins intense).

1.c) Absorption atomique, mais perte possible d'éléments volatils au cours du traitement de l'échantillon. Fluorescence X, mais analyse de surface essentiellement.

2.a) 2 g de KCl correspondent à 0,0268 mol. Si AgCl était récupéré en totalité, on aurait 3,845 g. Or on en retrouve 3,726 g. Le rendement massique est donc de 97 %.

2.b) 50 mL d'une solution de AgNO_3 ($M = 203,868 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$) à 15 % correspondent à 7,5 g de ce sel, soit $7,5 / 203,868 = 0,037$ mol. On remarque que la quantité d'ion argent est donc égale à $0,037 / 0,0268$ soit 1,38 fois la quantité stœchiométrique.

La valeur du comptage γ pour une récupération totale de ${}^{35}\text{Cl}$ est égal à $11\,203 / 0,97 = 11\,549$.

La quantité de chlore dans l'acier est de $11\,203 / 48\,600 \times 10 = 2,38 \mu\text{g}$, soit $4,66 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (4,7 ppm).

Exercice 17.4

a) l'activité de l'insuline libre s'obtient en retirant de l'activité totale celle de l'insuline complexée : 6 755, 8 889, 10 148, 10 909 et 9 900 pour l'inconnue ;

b) 0,510, 0,800, 1,030, 1,200 et 0,980 pour l'inconnue. ; $C = 6,6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Exercice 18.1

$$\%C = [10,56 \times (12/44) / 5,28] \times 100 = 54,55 ; \quad \%H = [4,32 \times (2/18) / 5,28] \times 100 = 9,09 ;$$

$$\%O = 36,36 \%$$

Si le composé a pour formule brute $\text{C}_x\text{H}_y\text{O}_z$ et en prenant $M = 88$ puisqu'il n'y a pas de pic significatif en SM au-dessus de 89 on pose : $12x / \%C = y / \%H = 16z / \%O = M / 100$; $x = 4$; $y = 8$; $z = 2$.

Exercice 18.2

a) Avantage : le dispositif à vapeur froide est spécifique du mercure ; inconvénient : seul le mercure inorganique est dosé.

b) Équation de la droite des moindres carrés : $[\text{signal}] = 858,33[\text{conc.}] - 0,46$; $C(\text{ppb}) = 0,06$.

Exercice 19.1

Soit x la concentration en ions H^+ ; $\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}^+$ ($K_a = 1,8 \times 10^{-5}$).

$K_a = x^2/(0,85 - x)$ soit $x = 0,0039$ donc $\text{H}^+ = 0,0039 \text{ M}$ soit $\text{pH} = 2,4$.

Le degré de dissociation sera de $(0,0039/0,85) \times 100 = 0,46 \%$.

Exercice 19.2

$[\text{Cd}^{2+}] = 0,01$; $E = E_0 - RT/nF \ln[\text{Red}]/[\text{Ox}]$; $E = -0,403 - (0,059/2) \times \log(1/0,01) = -0,462 \text{ V}$.

Exercice 19.3

La réaction est la suivante : $\text{Ti}^{3+} + \text{Fe}^{3+} \rightarrow \text{Ti}^{4+} + \text{Fe}^{2+}$; or on a ajouté 1,5 fois la quantité stœchiométrique nécessaire en Fe^{3+} il n'y aura plus de Ti^{3+} ; $[\text{Ti}^{3+}] = 0$; $[\text{Ti}^{4+}] = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$

$[\text{Fe}^{2+}] = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$; $[\text{Fe}^{3+}] = 2 \times 10^{-4} \text{ M}$ (la moitié de la valeur précédente).

Exercice 19.4

La première mesure faite sur la solution échantillon est du type : $E_1 = E'' + S \log C_X$. La seconde mesure est du type : $E_2 = E'' + S \log(C_X V_X + C_R V_R)/(V_X + V_R)$. Le terme $(C_X V_X + C_R V_R)/(V_X + V_R)$ représente la nouvelle concentration en composé dosé quand on ajoute le volume V_R de concentration C_R au volume V_X de concentration C_X :

$$\Delta E = E_2 - E_1 = S \log(C_X V_X + C_R V_R)/[(V_X + V_R)C_X]$$

$$\text{soit } 10^{\Delta E/S} = (C_X V_X + C_R V_R)/[(V_X + V_R)C_X] = V_X/(V_X + V_R) + C_R V_R/[(V_X + V_R)C_X]$$

En isolant C_X dans le premier membre de cette expression on retrouve la formule proposée.

Exercice 19.5

a) $\varepsilon_{\text{ac}} = 10^3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $\varepsilon_{\text{bas}} = 7 \times 10^3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

b) On utilise les équations de conservation de matière $[\text{Acide}] + [\text{Base}] = C$ et d'additivité des absorbances à $\text{pH} = 5,5$ soit :

$10^3[\text{Acide}] + 7 \cdot 10^3[\text{Base}] = 0,4$ ce qui permet d'atteindre $[\text{Acide}]$ et $[\text{Base}]$ à $\text{pH} = 5,5$ puis le $\text{pKa} = 5,5$. Pour $\text{pH} = 2$, on est à $\text{pKa} - 3,5$: on peut donc légitimement dire que tout le couple est sous forme acide. Pour $\text{pH} = 8$, on est à $\text{pKa} + 2,5$: on peut légitimement dire que tout le couple est sous forme basique. Donc les approximations sont justifiées.

Exercice 20.1

Le problème revient à calculer le rapport du nombre de transport du zinc vis-à-vis du nombre de transport de l'ensemble des autres ions présents en solution : le calcul conduit à :

$t_{\text{Zn}^{++}} = 6,98 \times 10^{-3}$. Pour 1 coulomb échangé, Zn^{++} transportera $6,98 \times 10^{-3} \text{ C}$ et le reste par la solution : $(1 - 6,98 \times 10^{-3}) = 0,993 \text{ C}$; $i_m/i_D = 7,03 \times 10^{-3}$ ou 0,007. Le transport du zinc vers l'électrode est contrôlé par la diffusion.

Exercice 20.2

20 gouttes, soit 0,16 g, sont tombées en 80 s. Le débit de mercure est $0,16/80 = 2 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1}$.

Pour une hauteur triple, le débit sera 3 fois plus important, soit $6 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1}$. Les gouttes ayant toujours la même masse, elles se succéderont au rythme de $(0,16/20)/(2 \times 10^{-3}) = 1,33 \text{ s}$.

Exercice 20.3

Par application de l'équation d'Ilkovic : $i_D = 7,15 \mu\text{A}$.

Exercice 20.4

1.a) $t = 1,93 \times 10^3 \text{ s}$ soit 32,16 min ;

1.b) Note : un tel courant de 1,5 nA est pratiquement indétectable. Mais si on opère en voltampérométrie à redissolution (*stripping voltammetry*), on va par exemple redissoudre cette quantité de zinc en 1 s, ce qui donnera cette fois un signal facile à détecter de : $i = 2,895 \mu\text{A}$.

2) Il faut 2 électrons pour réduire un ion zinc. La quantité de courant utilisée dans l'expérience est de $4,5 \times 10^{-3} \text{ C}$, ce qui permet de réduire $2,33 \times 10^{-8}$ mole de Zn : l'appauvrissement est de 0,12 %.

Exercice 20.5

Etalonnage du réactif : 1 mL de ce solvant a pour teneur en eau 3/15 mL de réactif de KF. Dans le dihydrate de l'acide oxalique ($M = 126 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), la concentration massique en eau est de 28,57 %. Les données permettent de trouver le titre du réactif : $T = 28,57 \times 205 \times 1/13 = 4,51 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Dosage : 10 mL de solvant « neutralisent » $10 \times 3/15 = 2 \text{ mL}$ de réactif, donc les 1,05 g de poudre de lait ont réagi sur $12 - 2 = 10 \text{ mL}$ de ce réactif. Il y a donc $4,51 \times 10 = 45,1 \text{ mg}$ d'eau dans l'échantillon, soit une concentration de $(45,1/1050) \times 100 = 4,3 \%$.

Exercice 20.6

Dans la version coulométrique du dosage de KF, 1 molécule d'eau nécessite 2 atomes d'iode et 2 électrons. Il faut donc $2 \times 96\,500$ coulombs (C) pour une mole, soit $1,8 \times 10^4 \text{ mg}$ d'eau ; 1 C correspond donc à $1,8 \times 10^4 / (2 \times 96\,500) = 0,0933 \text{ mg}$ d'eau. Cela correspond à la quantité d'eau dans 1 mL d'éther. Par litre il y a donc 93 mg d'eau. La concentration est $93/0,78 = 120 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (120 ppm).

Exercice 20.7

Au fur et à mesure que Fe^{++} s'oxyde au contact de l'anode, sa concentration diminue. Comme on opère à courant constant, le potentiel de l'électrode va augmenter. L'eau va alors s'oxyder, venant fausser le résultat du dosage. En revanche, en présence d'un sel Ce^{+++} , c'est lui qui va s'oxyder avant l'eau en Ce^{++++} . Ce dernier oxydera à son tour le Fe^{++} restant. La relation entre quantité de courant et concentration en Fe^{++} n'en sera pas affectée. Il faut néanmoins ajouter au milieu un indicateur de fin de présence de Fe^{++} .

Exercice 22.1

La valeur moyenne est de 650 avec $s = 1,581$. Pour le niveau de confiance indiqué, on relève dans la table de Student, la valeur $t = 2,776$. On peut alors calculer : $t \cdot s / (n)^{1/2} = 1,963$. Les résultats déterminent une plage $650 \pm 1,963$ dans laquelle on a 95 % de chance de trouver la vraie moyenne. Il y a probablement dans ces expériences une erreur systématique. Mais si on se fixait un niveau de confiance de 99 % ($t = 4,6$) on aurait $t \cdot s / (n)^{1/2} = 3,25$ et par conséquent une plage de $650 \pm 3,25$. La valeur de 653 serait incluse dans cet intervalle et serait donc admise.

Exercice 22.2

a) Chimiste A : $\bar{x} = 131,6$; $s = 1,56$; $\varepsilon = 0,3$; CV (RDS) % = 1,18 : juste et précis.

Chimiste B : $\bar{x} = 131,6$; $s = 5,37$; $\varepsilon = 0,3$; CV (RDS) % = 4,08 : juste mais non précis.

Chimiste C : $\bar{x} = 135,7$; $s = 1,33$; $\varepsilon = 3,8$; CV (RDS) % = 0,98 : non juste mais précis.

Chimiste D : $\bar{x} = 125,3$; $s = 9,93$; $\varepsilon = 6,6$; CV (RDS) % = 7,93 : non juste et non précis.

b) $F = (s_1/s_2)^2 = 11,88$. Or pour 6 et 6 mesures (voir tableau 22.3 p. 433), la valeur frontière est de 5,05. Donc les précisions de ces deux appareils sont significativement différentes.

Exercice 22.3

La valeur calculée de t (avec $n = 6$) pour le chimiste A ($s = 1,559$) est de 0,471. Cette valeur est nettement plus petite que celles qui sont relevées dans la table de t : 2,57 (pour 95 %) et 4,03 (pour 99 %). Il n'y a donc probablement pas d'erreur systématique. Mais pour le chimiste C ($s = 1,33$), on trouve $t = 4,05$, valeur qui indique une erreur systématique très probable.

Exercice 22.4

a) La valeur de $Q = (24,8 - 24,36)/(24,8 - 24,10) = 0,63$ est inférieure à celle que l'on trouve dans le tableau pour 5 mesures et un niveau de confiance de 95 % (valeur 0,64). On ne peut donc rejeter la valeur de 24,8.

b) En revanche si on refait le calcul en ajoutant les deux valeurs indiquées, Q demeurera inchangé mais dans la table pour 7 valeurs on aura 0,51. La valeur 24,8 est à rejeter.

Note : les valeurs de s et de la moyenne en incluant cette mesure ($s = 0,239$ et moyenne 24,29) ou en la rejetant ($s = 0,095$ et moyenne 24,21) sont très différentes. Si on prenait les valeurs médianes on aurait 24,24 (avec) et 24,22 (sans). La médiane semble ici préférable à la moyenne.

Exercice 22.5

Il faut calculer l'écart type « pooled » s_p : $s_p^2 = 0,065 = 0,2549^2$ et $t = 22$. Dans la table $t = 2,2$, donc les deux méthodes ne reviennent pas au même et conduisent donc à des résultats différents.

Exercice 22.6

Il s'agit d'un problème de comparaison de deux moyennes. La valeur moyenne des 4 analyses est de 98,73 avec $s_{n-1} = 0,155$. La « pooled standard deviation » des deux séries de valeurs est : $s_p = 0,118$. La valeur de t basée sur $(5+4-2)$ degrés de liberté conduit d'après la table à 2,365 pour un niveau de confiance de 95 %. On doit maintenant calculer $2,365 \times 0,118 \times [(4+5)/(4 \times 5)]^{1/2} = 0,187$ et comparer cette valeur à la différence des moyennes qui est égale à $99 - 98,73 = 0,23$. Cette dernière est supérieure, donc il s'agit de deux moyennes incompatibles pour le même lot.

Exercice 22.7

Si on considère que la loi de variation de l'absorbance avec la concentration est une droite, celle-ci aura pour équation : $A = 0,05[\text{conc}] + 0,08$. Les écarts sont relativement importants avec les points expérimentaux. On préférera un ajustement quadratique, et en plus sur une plage réduite de concentrations.

Exercice 22.8

Pour le blanc analytique, $s_{n-1} = 0,82$. La valeur de t calculée pour $(5+8)$ mesures est de 3,17. Donc $\Delta x = 3,17 \times 0,82 \times [(5+8)/(5 \times 8)]^{1/2} = 1,48$: la limite de détection est d'environ 1,5 mg.

Table des constantes physico-chimiques

Quelques constantes physico-chimiques		
désignation	symbole	valeur numérique (SI)
Nombre d'Avogadro	\mathcal{N}	$6,02252 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
Volume molaire d'un gaz parfait	V_0	$22,414 \times 10^{-3} \text{ m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$
Constante des gaz parfaits	R	$8,3143 \text{ J}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$
Constante de Boltzman (R/N)	k	$1,3806 \times 10^{-23} \text{ J} \cdot \text{K}^{-1}$
Constante de Planck	h	$6,6262 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$
Quantum de moment cinétique	$h/2\pi$	$1,0546 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$
Constante de Faraday	F	$96\,487 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$
Vitesse de la lumière dans le vide	c	$2,997925 \times 10^8 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$
Charge de l'électron	e	$1,60210 \times 10^{-19} \text{ C}$
Masse de l'électron au repos	m_e	$9,10953 \times 10^{-31} \text{ kg}$
Masse du neutron au repos	m_n	$1,67496 \times 10^{-27} \text{ kg}$
Masse du proton au repos	m_p	$1,67265 \times 10^{-27} \text{ kg}$
Unité de masse atomique	u (ua ou uma)	$1,660566 \times 10^{-27} \text{ kg}$

Bibliographie

ANALYSE CHIMIQUE ET CARACTÉRISATION. VOL P1, P2, P3, P4, ISTR, Techniques de l'ingénieur, Analyse et Caractérisation
0245.9639

ANALYTICAL CHEMISTRY

R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, H.M. Widmer, 1998, Wiley-VCH
3-527-28610-1

CAPILLARY ELECTROPHORESIS

Dale R. Baker, 1995, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons
Isbn 0-471-11763-3.

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE ET SUPERCRITIQUE

R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, 1991, Masson
2.225.82308.1

FUNDAMENTAL OF MODERN UV-VISIBLE SPECTROSCOPY

A. Primer, 1996, Hewlett-Packard® Company
12-5965-5123E

HÉTÉROGÉNÉITÉ, ÉCHANTILLONNAGE, HOMOGÉNÉISATION

P. Gy, 1988, Collection Mesures Physiques, Masson
2.225.81313.2

HIGH RESOLUTION GAZ CHROMATOGRAPHY, (third edition)

P. Sandra, 1989K.J. Hyver, Editor Hewlett-Packard® Company
5950-3562

ELECTROCHIMIE DES SOLIDES

C. Deportes, 1994, Presses Universitaires de Grenoble
2.7061.0585.2

FUNDAMENTALS OF ANALYTICAL CHEMISTRY (7th Int. Ed.)

D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, 1996, Saunders College Publishing
0.03.005938.0

INFRARED SPECTROSCOPY

W.O. George et P.S. McIntyre, 1987, Série ACOL, John Wiley & Sons
0.471.91383.9

INSTRUMENTAL ANALYSIS (IID Ed.)

G.D. Christian et J.E. O'Reilly, 1986, Allyn & Bacon Intl.

0.205.08685.3

INSTRUMENTATION IN ANALYTICAL CHEMISTRY

R. Murray, 1992, Louise Voress

0.8412.2202.9

JUGEMENT STATISTIQUE SUR ÉCHANTILLONS EN CHIMIE

J. Maurice, 1993, Polytechnica

2.84054.013.4

CHROMATOGRAPHIE EN PHASE LIQUIDE ET SUPERCRITIQUE

R. Rosset, M. Caude et A. Jardy, 1991, Masson

2.225.82308.1

LA SPECTROSCOPIE DE RMN

H. Gunther, J-J. Suffert, G. Ourisson, 1994, Masson

2.225.84029.6

MANUEL PRATIQUE DE CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

J. Tranchant, 1994, Masson

2.225.84681.2

MÉTHODES CHROMATOGRAPHIQUES COUPLÉES À LA SPECTROMÉTRIE DE MASSE

J de Graeve, F. Berthou, M. Prost, 1986, Masson

2.225.80627.6

MÉTHODES DE SÉPARATION, 2ÈME ÉDITION

G. Mahuzier et M. Hamon, 1990, Abrégés de chimie analytique, Masson

2.225.81849.1

MÉTHODES SPECTROSCOPIQUES POUR LA CHIMIE ORGANIQUE

M. Hesse, H. Meier et B. Zeeh, 1997, Masson

2-225-83050-9

PRACTICAL THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

B. Fried et J. Sherma, 1996, Springer-Verlag

0.8493.2660.5

PRINCIPLES OF INSTRUMENTAL ANALYSIS, 5TH ED.

D.A. Skoog, F.J. Holler et T.A. Nieman, 1998, Saunders College Publishing

0.03.002078.6

QUANTITATIVE ANALYSIS

R.A. Day et A.L. Underwood, 1991, Prentice Hall

0.13.747361.3

SPECTROMÉTRIE DE MASSE, PRINCIPE ET APPLICATIONS

E. Constantin et A. Schnell, 1986, Technique et documentation, Lavoisier

2.85206.352.2

SPECTROMÉTRIE DE MASSE

E. De Hoffmann, J. Charette et V. Strobant, 1994, Masson

2.225.84582.4

STATISTICS FOR ANALYTICAL CHEMISTRY (3RD EDIT.)

J.C. Miller & J.N. Miller, 1993, Ellis Horwood PTR Prentice Hall

0.13.030990.7

Index

A

absorbance, 144, 159
acide éthylènediaminetétracé-
tique, 258
affinité électronique, 146
analyse de certitude, 53
analyse de confirmation, 163
analytes, 414
anisotropie, 290
anticathode, 226
anticorps, 363, 417
antigène, 363
APCI, 340
ATR, 157

B

Bainbridge, 318
bande passante, 273
barrette de diodes, 153
Beer et Lambert, 158
biocapteur, 404
blanc analytique, 154
blindage, 288
Bloch, 277

C

calomel, 395
capteur lambda, 392
carbone
graphité, 72
total, 380

Carbowax, 71
20M, 71
catharometre, 74
cathodes creuses, 248
cercle de Rowland, 269
chimiluminescence, 219
chromatogramme, 8
chromatographie
bidimensionnelle, 84
d'exclusion stérique CES, 114
en phase supercritique, 108
ionique, 88
liquide capillaire, 57
rapide, 78
sur couche mince, 100
chromophores, 146
Chromosorb, 68
CIEF, 133
Clark, 401
coefficient
d'absorption linéique, 236
d'adsorption, 25, 46
de corrélation, 435
de détermination, 435
de diffusion, 26, 115
de distribution ionique, 26
de partage, 26, 46
de réponse absolu, 27, 29
de variation (CV), 428
colonne(s)
« 530 μm », 69
capillaires, 65, 68
de garde, 42
remplies, 68
WCOT, 69
compteur
à scintillations, 230
proportionnel, 230
conductance, 94
équivalente ionique, 94
spécifique, 94
constante
d'écran, 288
de couplage, 293
gyromagnétique, 279
constantes
de McReynolds, 83
couplage
hétéronucléaire, 292
homonucléaire, 292
courant
capacitif, 398
de diffusion, 397, 398
ionique total (TIC), 78
courbe
d'erreur, 429
de Gauss, 11
cyclodextrines, 48

D

débit optimal, 21
découplage de spin, 298
densitomètres, 105
déplacement chimique, 288

- dépolarisant, 394
- détecteur
- à émission atomique, 78
 - à barrette de diodes, 53
 - à capture d'électrons (ECD), 75
 - à conductibilité thermique (TCD), 74
 - à conductivité, 94
 - à effet pyroélectrique, 188
 - à ionisation de flamme (FID), 74
 - à photo-ionisation (PID), 76
 - à semi-conducteur, 188
 - infrarouge, 78
 - réfractométrique, 56
 - spectrofluorimétrique, 54
 - thermoionique (NPD), 75
 - ultraviolet, 78
- détection
- monochromatique, 53
 - polychromatique, 53
 - UV, 52
- déviation
- moyenne, 437
 - standard, 428
- diffusion
- Raman, 210
 - Rayleigh, 210, 225
- digesteurs, 424
- dispersion
- linéaire, 273
 - réciroque, 273
- donneur-accepteur, 145
- DPP, 406
- droite
- de Henry, 434
 - de Kovats, 81
- DTGS, 188
- durée de vie, 205
- E**
- écart quadratique, 428
- écart
- type relatif, 428
- écoulement électro-osmotique, 126
- EDXRF, 232
- effet
- bathochrome, 147, 148
 - Compton, 225
 - hyperchrome, 147
 - hypsochrome, 148
 - photoélectrique, 224
 - Zeeman, 254
- efficacité théorique, 15
- électrochromatographie
- capillaire, 135
- électrode
- auxiliaire, 394
 - de référence, 383, 394
 - de travail, 394
 - de verre, 385
 - indicateur, 394
 - ionique, 383
 - sélective, 405
- electronic pressure control, 63
- électrophorégramme, 126
- électrophorèse capillaire
- de zone (CZE), 131
 - électrocinétique micellaire (MEKC), 131
 - sur gel (CGE), 132
- electrospray, 340
- ELISA, 221, 363
- émission optique, 262
- EMIT, 366
- EPC, 63
- équation
- de Golay, 22
 - de Knox, 23
 - de Nernst, 384
 - de Van Deemter, 21, 63, 111
- erreur
- alcaline, 386
 - totale, 427
- espace
- de tête, 64, 420
- étalon interne, 30
- étalonnage
- externe, 28
 - multipoints, 29
- exactitude, 427
- exclusion stérique, 115
- F**
- facteur
- d'asymétrie, 11
 - de capacité, 17
 - de correction de compression J , 63
 - de pente, 389
 - de résolution, 19
 - de rétention k , 17
 - de rétention relative, 19
 - de séparation, 18
 - de traînée, 11
- fentes de Sollers, 233
- FID, 286
- fidelite, 427
- filtration
- sur gel, 26, 114
- filtres quadripolaires, 325
- fluides supercritiques, 108
- flux électro-osmotique, 126
- formule
- brute, 375
 - de déflexion, 322
- four graphite, 251
- free induction decay, 286
- front de solvant, 101
- FTMS, 330
- FWHM, 332
- G**
- gaz vecteur, 61
- gel de silice, 43
- Globar, 187
- GPC, 116
- gradient
- d'élution, 39
 - haute pression, 39
- Gram-Schmidt, 196, 197
- groupements silanols, 43
- H**
- haptènes, 363
- hauteur de plateau réduite, 16
- HEPT, 12
- hétéronucléaires, 292
- HIC (*hydrophobic interaction chromatography*), 51
- I**
- immuno
- extraction, 417
 - fluorescence, 367
- IMS, 324
- indice de rétention de Kovats, 81

injecteur

- à température programmable, 66
- à vaporisation directe, 65
- automatique, 64
- avec ou sans division, 65

injection

- à froid dans la colonne, 67
- hydrostatique, 129
- par électromigration., 129

insert, 65

interférogramme, 183

interféromètre de Michelson, 183

ionisation

- chimique, 337
- électronique, 336

ionophore, 387

ionspray, 340

IRM, 299

ISAB, 390

J

JCAMP.DX, 193

justesse, 427

K

Karl Fischer, 407

Kirchhoff, 242

Kjeldahl, 377, 424

Kubelka-Munk, 193

L

l'écart-type, 428

l'électrophorégramme, 124

l'intervalle de confiance, 431

lampe

- à arc xénon, 212
- à deutérium, 254
- pulsée, 256

lampe(s)

- sans électrodes, 249

largeur

- à mi-hauteur, 11
- de fente, 151

ligne de base, 9

limite de détection, 258

loi

- de Beer, 209
- de Hooke, 178

M

machines de Charpak, 105

Make-up, 76

MALDI, 338

marqueur neutre, 127

Martin, 13

masse réduite, 178

masse(s) nominales, 317

MCT, 188

mediane, 437

médiane, 426

membrane, 383

méthode

- de Thiel, 437
- par normalisation interne, 32
- PCA, 200
- PLS, 200

micro-bore, 41

microanalyse, 375, 376

microanalyse X, 230

microscopes électroniques, 229

minéralisation, 423

MLR, 199

MLS, 166

mobilité

- apparente, 128
- électro-osmotique, 126
- électrophorétique, 126
- mode isocratique, 39
- modèle des plateaux, 11
- moment magnétique nucléaire, 279

monochromateur, 270

monolithes, 44

Morton et Stubbs, 167

mouvement de précession, 285

moyenne, 426

moyenne vraie, 427, 430

N

nano

- CCM, 100
- chromatographie, 57

néphélométrie, 172

nombres d'onde, 176

NUJOL, 191

O

optimisation simplexe, 438

optique Cassegrain, 196

P

PCR, 166

peak matching, 322

PEEK, 37

perméation de gel, 26, 114

phase

- mobile, 7
- stationnaire, 7

phase(s)

- monomériques, 46
- polymériques, 46
- stationnaires chirales, 71
- stationnaires solides, 72

phosphorescence, 142

photoelectron, 224

photométrie de flamme, 253, 263

pic

- d'élution, 11
- de base, 317
- diffus, 354
- système, 93

PIC(*paired ion chromatography*), 50

pic(s)

- chromatographiques, 9
- métastables, 353

plateau théorique, 12, 13

PLOT, 69

PLS, 166

point critique, 108

polarogramme, 399

polyéthylèneglycols, 70

polyéthylèneglycols (PEG), 71

polysiloxanes, 70

pompes débitmétriques, 38

POPOP, 361

Porous Layer Open Tubular, 69

potentiel d'ionisation, 146

pouvoir de résolution, 273, 332

precision, 428

pression critique, 108

prisme magnétique, 322

pseudo-absorbance, 176

Q

quadrupôle, 326

quadruplet, 295

quenching

- chimique, 208
- couleur, 208

R

R_f , 103
 radio-immunologie, 359
 rapport de phase, 62, 73
 rayonnement blanc, 226
 réactif fluorophore, 216
 réflexion
 diffuse, 191
 spéculaire, 191
 totale atténuée, 191
 réfractomètre différentiel, 118
 relation
 de Bragg, 234
 de Larmor, 282, 288
 relaxation vibrationnelle, 207
 reproductibilité, 428
 retardation factor, 105
 $RP-TLC$, 101
 RSD, 428

S

sélectivité, 24
 self quenching, 210
 séparatrice, 183
 septum, 65
 silices greffées, 45
 son temps de migration, 128
 source de Nernst, 187

spectre
 continu, 317
 de fragmentation, 317
 Spherosil, 68
 squalane, 70
 student, 431
 substœchiométrique, 359
 supprimeur, 95
 Synge, 13
 système des indices de rétention,
 80

T

tamis moléculaires, 72
 technique ATR, 192
 temp(s)
 de migration, 8
 de rétention, 9, 17
 de rétention réduit, 10
 de relaxation, 287
 mort, 9
 température critique, 108
 test
 de Dixon, 434
 paramétrique, 432
 tétraméthylsilane, 289
 TISAB, 390
 TOF, 323

torche à plasma, 264
 transfert de charge, 142
 transmittance, 143, 176
 triangle de Pascal, 296
 triplet, 295
 Tswett, 8

V

valeur
 centrale, 426, 429
 vraie, 427
 Van Deemter, 20
 vanne
 à boucle, 64
 d'injection, 40
 variance, 428, 432
 vecteur magnétisation, 285
 vitesse limite de migration, 125
 voltampérogramme, 394
 volume
 d'élution, 9
 de rétention, 17
 interstitiel, 114
 mort, 17

W

Wall Coated Open Tubular, 69
 WDXRF, 233

048425 - (III) - (1,5) - OSB 80° - PUB - MPN

Achevé d'imprimer sur les presses de
 SNEL Grafics sa
 Z. I. des Hauts Sarts - Zone 3
 Rue Fond des Fourches 21 - B-4041 Vottem (Herstal)
 Tél +32 (0)4 344 65 60 - Fax +32 (0)4 286 99 61
 juillet 2007 - 42443

Dépôt légal : septembre 2004; suite du tirage, août 2007
 Dépôt légal de la 1^{re} édition : septembre 1992

Imprimé en Belgique